

ZELLULÄRE REAKTIONEN DER HAUT VON RINDERN
NACH MEHRFACHEM BESATZ MIT AMBLYOMMA VARIEGATUM
UND HYALOMMA ANATOLICUM EXCAVATUM
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON
EOSINOPHILEN GRANULOZYTEN UND MASTZELLEN

Petra-Iris Schillinger

Diss
München
1905



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Gothe

ZELLULÄRE REAKTIONEN DER HAUT VON RINDERN NACH MEHR-
FACHEM BESATZ MIT AMBLYOMMA VARIEGATUM UND HYALOMMA
ANATOLICUM EXCAVATUM UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTI-
GUNG VON EOSINOPHILEN GRANULOZYTEN UND MASTZELLEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

vorgelegt von
Petra-Iris Schillinger
aus
Augsburg

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. H.G. Liebich

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

Die Anfertigung der Dissertation wurde mit Mitteln des
Stipendiums nach dem Gesetz zur Förderung des wissen-
schaftlichen und künstlerischen Nachwuchses vom 18.12.84
gefördert.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
II. Zelluläre und humorale Abwehrreaktionen des Rindes gegen Schildzeckeninfestation (anhand der Literatur).....	2
III. Eigene Untersuchungen.....	12
A. Material und Methoden.....	12
B. Ergebnisse.....	16
I. Amblyomma variegatum.....	16
1. Zementablagerung.....	16
2. Epidermisveränderungen.....	17
3. Veränderungen im Korium.....	18
II. Hyalomma anatolicum excavatum.....	23
1. Zementablagerung.....	23
2. Epidermisveränderungen.....	24
3. Veränderungen im Korium.....	28
IV. Besprechung der Ergebnisse.....	34
V. Zusammenfassung.....	46
Summary.....	47
VI. Literaturverzeichnis.....	49
Lebenslauf	

I. Einleitung

Auf 8 Milliarden Dollar schätzen Experten die Verluste, die 1983 weltweit durch Zecken bei Rindern verursacht wurden. Die Schädigung der Wirtstiere erfolgt entweder durch direkte Einwirkung (Zeckenparalyse, Hautveränderungen, Anämie) oder indirekt durch Übertragung von Krankheitserregern (z.B. Babesien, Theilerien, Rickettsien). Hinzu kommen Sekundärinfektionen der Bißstellen (Pyodermien).

Bisher zur Zeckenbekämpfung eingesetzte Akarizide sind teuer und umweltbelastend und werden durch die steigende Resistenz der Ixodiden immer wirkungsloser. Als Alternativen bieten sich die Zucht resistenter Rinderrassen und ein Einsatz von Schadinsekten an. Es mehren sich ferner Hinweise, daß Rinder nach wiederholtem Zeckenbefall eine gewisse Immunität entwickeln, die einen Neubefall verhindert oder zumindest die Zahl der sich vollsaugenden Zecken verringert. Dabei spielen sowohl humorale als auch zellvermittelte Reaktionen eine Rolle, wie dies bisher vornehmlich an den Modellen Meerschweinchen/Zecke und Kaninchen/Zecke sowie in wenigen Fällen am Rind und Schaf festgestellt wurde. Es war das Ziel meiner Arbeit, zelluläre Reaktionen der Rinderhaut nach wiederholter Infestation mit den Schildzecken *Hyalomma anatolicum excavatum* und *Amblyomma variegatum* histologisch zu erfassen.

II. Zelluläre und humorale Abwehrreaktionen des Rindes gegen Schildzeckeninfestation (anhand der Literatur)

Um die Abwehrreaktionen des Rindes gegen Schildzecken zu er-
hellen, beschäftigten sich zahlreiche Autoren mit den histo-
pathologischen Veränderungen der Haut in der Umgebung der
Einstichstelle.

PAVLOVSKY und ALFEEVA (1941) verwendeten bei ihren Untersu-
chungen Hautstücke von Rindern, an denen Ixodes ricinus-Adulte
gesaugt hatten. Die Proben wurden nach Formalinfixierung und
Celloidineinbettung mit Hämatoxylin-Eosin oder nach van Gies-
son bzw. nach Weigert gefärbt. Die Autoren beschrieben eine
Nekrose der Epidermis an der Penetrationsstelle und eine ober-
flächliche, gleich nach Beginn des Saugaktes auftretende Ze-
mentablagerung. Im Laufe von 7-10 Tagen umschloß die kerati-
nisierte Epidermis das Hypostom der Zecke auch in der Tiefe
völlig. Im Korium richteten sich die Kollagenfasern in radiä-
ren Bündeln um das Hypostom zur Außenseite der Bißstelle hin
aus, während die elastischen Fasern gänzlich verschwanden.
Das entzündliche Infiltrat enthielt Riesenzellen und Lymphoid-
zellen. WIKEL und ALLEN (1982) interpretierten diese Riesen-
zellen als Mastzellen und die keratinisierte Epidermis als
Zementablagerung.

UZAKOV (1963) nannte in einem Überblick über Veränderungen
der Rinderhaut nach Befall mit Schildzecken als weitere Cha-
rakteristika eine Dilatation der oberflächlichen und tiefen
Gefäße sowie ein Einwandern von eosinophilen Granulozyten
und Lymphoidzellen ins Korium; letztere wurden, wie bei PAV-
LOVSKY und ALFEEVA (1941), jedoch nicht näher definiert. Des
weiteren war die Epidermis ödematös verändert und enthielt
Blasen.

Hautveränderungen nach experimenteller Infestation mit der
einwirtigen Zecke Hyalomma scupense beschrieb KUZNETSOVA
(1957). Sie entnahm Hautbiopsien zum Zeitpunkt des Larven-,

Nymphen- und Adultenstadiums, bettete sie nach Formalinfixierung in Celloidin ein und färbte die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin. Die Intensität der Hautveränderungen nahm von Stadium zu Stadium zu. Bei Adulten-Befall fehlte die Epidermis an der Einstichstelle, die benachbarten Anteile zeigten ein Anschwellen der Kerne sowie Desintegration und Lysis. Das Korium war bis zur Subkutis zellulär infiltriert. Direkt im Anschluß an den Zement, der deutliche Abdrücke des Hypostoms zeigte, folgte eine Ansammlung von Zelldetritus, der vor allem aus zugrundegehenden polymorphkernigen Zellen bestand. In der Pars papillaris des Koriums waren eosinophile Granulozyten, Histiozyten und Zellen mit ovalen blassen Kernen diffus verteilt. In der Pars reticularis dagegen traten diese Zellen zusammen mit Lymphoid- und Epitheloidzellen in direkter Nachbarschaft zu den Gefäßen auf, welche Endothelschwellungen aufwiesen und in ihren Lumina viele eosinophile und neutrophile Granulozyten zeigten. Die Kollagenbündel neben dem Zement verloren ihre typische fibrilläre Struktur, erschienen homogen und reagierten basophil. KUZNETSOVA (1957) vermutete, daß die Veränderungen sowohl durch den Zeckenspeichel als auch durch Reaktionen des Wirtsorganismus bedingt seien.

Während die oben genannten Autoren Rinder verwendeten, deren Abwehrlage gegenüber Zecken nicht bekannt war, ging RIEK (1962) auf die zellulären Hautreaktionen bei Rindern mit definierter Resistenzlage gegen Boophilus microplus ein. Er teilte in Versuchen Rinder nach der Zahl der an ihnen vollgesogenen Zeckenweibchen sowie deren Gewicht und Eimassegewicht in hoch-, mittel- und nicht resistente Tiergruppen ein. Es wurden Hautbiopsien entnommen und die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin bzw. mit Toluidinblau gefärbt. Dabei machte der Autor keine genauen Angaben über Schnittdicke und über den genauen Zeitpunkt der Probenentnahme, beschrieb aber den zeitlichen Ablauf der Gewebeveränderungen. Bei hochresistenten Tieren war bereits 12-24 Stunden nach Larvenansatz ein schwaches Ödem im Korium vorhanden, desgleichen traten zahlreiche Eosinophile auf. Nach

48 Stunden war diese Reaktion ausgeprägter, das entzündliche Infiltrat reichte bis tief ins Korium. Bei manchen hochresistenten Rindern kam es in der Epidermis zur Bildung von Blasen, die mit polymorphkernigen Leukozyten, vor allem mit Eosinophilen gefüllt waren. Hochresistente Tiere zeigten einen höheren Anteil an Mastzellen im Korium als weniger resistente. Bei nicht resistenten Rindern wanderten erst nach 4 Tagen polymorphkernige Zellen ein, wobei die Reaktion umschrieben blieb. Freie Erythrozyten im Gewebe deuteten auf Hämorrhagien hin. Bei einigen empfänglichen Tieren unterwanderte die Epidermis die Anheftungsstelle. Aus seinen Untersuchungen schloß der Autor auf eine Allergie vom Soforttyp I. Dabei kommt es seiner Ansicht nach durch den Kontakt von Zeckenantigenen mit Antikörpern auf der Mastzelloberfläche zu einer Histaminfreisetzung, wobei Eosinophile die entzündliche Reaktion dämpfen.

SCHLEGER und Mitarb. (1976) wiesen den Mastzellen und Eosinophilen ebenfalls eine Hauptrolle im Abwehrgeschehen gegen *Boophilus microplus* zu. Sie untersuchten die histologischen Veränderungen der Anheftungsstelle 3 Stunden nach Infestation mit *Boophilus microplus*-Larven. Dabei standen 6 hochresistente Kälber (0-20 vollgesogene Zeckenweibchen pro 1000 angesetzte Larven), 6 schwachresistente (100 vollgesogene Weibchen pro 1000 angesetzte Larven) und 6 Kälber ohne vorherigen Zeckenkontakt zur Verfügung. Die Proben wurden zu 8 µm und zu 0,5 µm dicken Schnitten verarbeitet, die mit Alkohol-Eosin, gefolgt von Azur-II-Methylenblau, gefärbt wurden. Die Experimentatoren stellten fest, daß es bei hochresistenten Tieren zu einer stärkeren Reduktion der Zahl der Mastzellen kam als bei schwachresistenten, wobei freie und phagozytierte Mastzellgranula auf einen Mastzellzusammenbruch hinwiesen. Bei hochresistenten Rindern wanderten mehr Eosinophile direkt unter der Einstichstelle ein als bei schwachresistenten. Diese infiltrierten die Epidermis, ihrer Degranulation folgte die Bildung von Mikrovesikeln und Blasen. Daneben enthielt das Infiltrat neutrophile und ganz vereinzelt basophile Granulozyten. Bei

Kälbern ohne vorausgegangenen Zeckenkontakt blieben die Mobilisierung der Eosinophilen und der Mastzellzusammenbruch aus. Wie RIEK (1962) interpretierten die Autoren diese Veränderungen als Reaktion von Soforttyp I. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnten SCHLEGER, LINCOLN und KEMP (1981) ihre Auffassung untermauern, daß die Eosinophilen das Mastzellhistamin zur Anheftungsstelle transportieren, nicht aber die entzündliche Reaktion dämpfen.

Auch TATCHELL und MOORHOUSE (1968) untersuchten die Gewebeveränderungen nach Befall mit *Boophilus microplus*. Sie nahmen Proben über einen Zeitraum von 21 Tagen (Larven-, Nymphen- und Adultenstadium). 7 µm dicke Schnitte wurden mit Mayer's Hämalaun und Eosin, zum speziellen Nachweis von Rindereosinophilen auch mit Lendrum's Carbolchromotrop gefärbt. Als Versuchstiere wurden Zebus (*Bos indicus*) und Shorthornrinder (*Bos taurus*) verwendet, die nach vorher ermittelter Zeckenabfallrate in resistente und empfängliche Tiere eingeteilt wurden. Sowohl bei empfänglichen als auch bei resistenten Rindern bildete sich ein Hohlraum unter den Mundwerkzeugen, der Neutrophile, Lymphozyten und Erythrozyten enthielt. Bei Erstbesatz zeigte sich nur bei den europäischen Rindern eine schwache Eosinophileneinwanderung; sie war bei Zweitbesatz verstärkt. Bei *Bos indicus* wanderten erst beim zweiten Ansatz Eosinophile ein; auch war die Reaktion schwächer als bei *Bos taurus*. Der bei beiden Rinderrassen nach Reinfestation auftretende Verschuß von Blutgefäßen durch Lymphozyten und Plasmazellen wurde von den Autoren jedoch nicht in kausalen Zusammenhang mit einer Resistenzbildung gebracht. Sie interpretierten die Eosinophileninfiltration als Sofortreaktion von Typ I und sahen die schwächere Reaktion der Zebus als Zeichen eines evolutionsbedingten Gleichgewichts zwischen *Bos indicus* und *Boophilus microplus* an.

Nach subkutaner Injektion von Extrakten ungesogener Rhipicephalus appendiculatus-Larven stellten BINTA und CUNNINGHAM

(1984) eine allergische Reaktion fest; sie äußerte sich in schmerzhafter Papelbildung, trat aber nur bei Tieren auf, die schon Zeckenkontakt gehabt hatten. Die histologische Untersuchung der Injektionsstelle ergab 30 Minuten und 6 Stunden nach Applikation des Extraktes ein Vorherrschen von polymorphkernigen Leukozyten (vor allem Neutrophilen) im Korium sowie einen progressiven Anstieg der Zahl der Eosinophilen. Ein nach 30 Minuten in der Epidermis auftretendes Ödem verebbte nach 6 Stunden wieder. Bei Kälbern mit Erstkontakt traten nur vereinzelt polymorphkernige Leukozyten in Erscheinung.

Schon COWDRY und DANKS (1933) hatten nach Ansatz von Rhipicephalus appendiculatus-Larven am Ohr eines Kalbes am ersten Tag nur eine oberflächliche Zementablagerung und erst am 2. Tag ein vermehrtes Auftreten von polymorphkernigen Leukozyten (Neutrophilen und Eosinophilen) im Korium beobachtet. Des weiteren fielen eine Schwellung der Kapillarendothelien, Hämorrhagien sowie eine Lyse der Histiozyten und Fibroblasten im Korium auf.

ALLEN, DOUBE und KEMP (1977) ordneten erstmals den basophilen Granulozyten eine Schlüsselposition in der Abwehr gegen Zecken zu. Sie entnahmen bei Versuchen mit Ixodes holocyclus-Weibchen, die auf 5 Kälbern bekannter Resistenzlage saugten, nach 0, 1, 4, 12, 24 und 40 Stunden Hautproben und stellten daraus 1-2 µm dicke Schnitte her, die mit Toluidinblau und PAS gefärbt wurden. Bei Erstbesatz blieb die Epidermis relativ intakt (abgesehen von einer geringen Spongiose nach 24 Stunden), nur wenige Neutrophile und Eosinophile wanderten in das Korium ein. Dagegen zeigte die Epidermis bei Drittbesatz bereits nach 1 Stunde eine Spongiose, die sich nach 12 Stunden zu einer Blasenbildung gesteigert hatte. Basophile, die bereits nach 1 Stunde im subepidermalen Bereich aufgetreten waren, wanderten in die Epidermis ein; sie verursachten Blasen, die nach 24 Stunden so groß waren, daß die epidermal-

dermale Grenze aufgehoben wurde. Diese Blasen enthielten Flüssigkeit, Eosinophile, Neutrophile und Erythrozyten. Auffällig war, daß sich die Zahl der Eosinophilen und Mastzellen im Laufe der Ansätze nicht veränderte. Die Experimentatoren sahen die Basophilen als Effektorzellen der Immunantwort an; im Meerschweinchen-Zecken-Modell konnte diese Basophilie auf komplement- und T-lymphozytenabhängige Faktoren zurückgeführt werden.

Eine Zunahme der Basophilen beobachteten auch BROWN, BARKER und ASKENASE (1984) bei Versuchen mit Amblyomma americanum-Adulten. Es wurden 12 Holsteinkälber verwendet und 3 Ansätze durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Infestation. Für die Lichtmikroskopie wurden 5 µm dicke Schnitte nach Giemsa, für die Elektronenmikroskopie mit Uranyl-Azetat und Bleizitrat gefärbt. Die Basophilen traten beim 1. Ansatz erstmals nach 24 Stunden im Korium auf und machten nach 48 Stunden 19% des entzündlichen Infiltrates aus. Beim 2. Ansatz erschienen sie bereits nach 6 Stunden und erreichten einen Anteil von 13% des Infiltrates; im 3. Ansatz waren sie ebenfalls schon nach 6 Stunden da und machten einen Anteil von 34% aus. Die Zahl der Eosinophilen im Korium erhöhte sich nach 24-48 Stunden parallel zur Basophilendegranulation im 2. Ansatz, ging jedoch im 3. Ansatz auf Kosten der Basophilen zurück. Mastzellen machten bei Erstbesatz 10% des entzündlichen Infiltrates aus, beim 2. und 3. Ansatz je 5%. Mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten) waren bei allen Ansätzen in großer Zahl vorhanden. In der Epidermis kam es über den Basophilenansammlungen zu Blasenbildung. Die Autoren interpretierten die zellulären Reaktionen als kutane basophile Hypersensitivität. Dabei geht der Aktion der Basophilen als Initialereignis eine Mastzelldegranulation voraus, die eine erhöhte Gefäßpermeabilität bedingt; dadurch können Granulozyten an den Ort des Geschehens wandern. Die Basophilen wirken nach Ansicht der Verfasser direkt toxisch auf die

Zecke, erhalten außerdem die Gefäßpermeabilität aufrecht und locken durch chemotaktische Faktoren Eosinophile an.

Zum Nachweis von Allergenen bei Zeckeninfestation des Rindes und von Antikörpern in der Haut wurden verschiedene Methoden verwendet. Beim Intrakutantest wird die Haut des Probanden 30 Minuten nach Injektion des Antigens auf Dickenzunahme, Papelbildung und Rötung untersucht. Die Messungen können zur Unterscheidung von Sofort- und Spätreaktionen, die erst nach 24 Stunden auftreten, auf einen längeren Zeitraum ausgedehnt werden. Im Gegensatz dazu wird beim passiven kutanen Anaphylaxie-Test (PCA) bzw. bei der Prausnitz-Küster-Reaktion (P-K) Serum sensibilisierter Tiere einem Versuchstier, das noch keinen Kontakt mit dem Allergen hatte, intradermal appliziert. Das zu prüfende Antigen wird nach 24 Stunden entweder ebenfalls intradermal (P-K) oder intravenös zusammen mit einer Evans'Blaulösung injiziert. Eine positive Reaktion äußert sich in einer allergischen Hautreaktion mit Rötung und Schwellung, wobei erhöhte Gefäßpermeabilität an der Stelle des Zusammentreffens von Antikörper und Antigen eine Blaufärbung der Haut auslöst. Mit diesem Test werden IgE-Antikörper, auch Reagine oder homozytotrope Antikörper genannt, und teilweise auch IgG₁-Antikörper nachgewiesen.

Im Intrakutantest überprüfte RIEK (1962) sowohl Rinder, die 2 Wochen vor der Infestation mit Boophilus microplus-Larven Larvenextrakte 5 Tage lang subkutan erhalten hatten, als auch solche, die ohne Vorbehandlung infestiert wurden. Bei der ersten Gruppe ließen sich bereits nach der ersten Infestation positive Reaktionen nachweisen, bei der zweiten erst nach Zweit- und Mehrfachbesatz. Es konnte allerdings keine Korrelation zwischen Resistenzgrad und Hautsensibilität festgestellt werden.

Dies gelang WILLADSEN und Mitarb. (1978) nach Isolation von 2 Zeckenallergenen aus dem Speichel von B. microplus. Die auf Injektion der Allergene folgende Sofortreaktion fiel umso stär-

ker aus, je resistenter die Tiere waren.

Eine Sofortreaktion nach Injektion von *Rhipicephalus appendiculatus*-Larvenextrakt konnten BINTA und CUNNINGHAM (1984) nur bei solchen Rindern auslösen, die schon Kontakt mit Zecken gehabt hatten.

Ähnliche Ergebnisse hatte ROSENBERG (1984) bei Versuchen mit *R. appendiculatus*-, *H. a. excavatum*- und *A. variegatum*-Adulten. Sofortreaktionen traten nach 30 Minuten, zusätzlich dazu bei *R. appendiculatus* schwach positive, bei *H. a. excavatum* stärker ausgeprägte Spätreaktionen nach 24 Stunden auf. Die Versuchskälber zeigten eine gewisse Resistenz gegen *R. appendiculatus* und *H. a. excavatum*, die sich bei beiden Zeckenarten in einer Verringerung der Eigelegegewichte und der Abfallgewichte adulter Zeckenweibchen, bei *R. appendiculatus* zusätzlich in einer Verminderung der Zahl abgefallener Weibchen äußerte.

Auch WIKEL und OSBURN (1982) wiesen bei Kälbern und Kühen nach Besatz mit *Dermacentor andersoni*-Adulten Sofort- und Spätreaktionen nach; bei den ersteren war die Haut ödematös, bei letzteren indurativ verändert. Auffällig war, daß die Kälber bereits nach der 1. Infestation Sofort- und Spätreaktionen zeigten; letztere traten bei Kühen erst nach 3 Besätzen auf.

Der Nachweis homozytotroper Antikörper gelang RIEK (1962) mittels eines Prausnitz-Küster-Testes. Er übertrug Serum von Rindern, die gegen *Boophilus microplus* resistent waren, auf Empfängertiere. Bei darauffolgender intradermaler Injektion von Larvenantigen zeigten die Rinder Sofortreaktionen.

Zum gleichen Ergebnis kamen WILLADSEN und Mitarb. (1978). Sie verwendeten keinen Gesamtlarvenextrakt, sondern isolierten 2 Allergene, die beide Sofortreaktionen im Intrakutantest und im Prausnitz-Küster-Test hervorriefen. Es ergab sich jedoch keine positive Korrelation zwischen Resistenzgrad der

Rinder und IgE-Serumspiegel, wohl aber zwischen Resistenzgrad und Stärke der Sofortreaktion. Die Autoren schlossen daraus, daß die Allergene nicht notwendigerweise mit bovinem IgE reagieren müssen.

Einen heterologen passiven Anaphylaxie-Test führte ROSENBERG (1984) aus. Sie erreichte bei einer Ziege, die verschiedene Seren von gegen *H. a. excavatum* resistenten Rindern intradermal erhalten hatte, nach i.v. Applikation von Speicheldrüsenantigen eine positive Reaktion bei den Seren, welche im ELISA Maximaltiter aufwiesen.

Hinweise darauf, daß die Resistenz gegen Zecken beim Rind neben dem zellulären auch einen humoralen Anteil hat, ergeben sich aus Untersuchungen von ROBERTS und KERR (1976). Sie übertrugen Plasma hochresistenter und schwachresistenter Rinder auf Empfängertiere, die mit *B. microplus*-Adulten infestiert wurden. Bei den Rezipienten von Plasma hochresistenter Tiere war die Zahl vollgesogener Zecken gegenüber Kontrolltieren deutlich geringer. Plasma schwachresistenter Tiere hatte dagegen keine Wirkung.

Mittels Immunfluoreszenz und Immunelektrophorese konnte BROSARD (1976) Antikörper gegen *B. microplus*-Larven nachweisen. Er beobachtete erste Titer 14-18 Tage nach Infestationsbeginn; die Konzentrationen blieben während eines Mehrfachbesatzes gleich hoch und sanken nach dem Abfallen der letzten Adulten wieder.

Nach Injektion von 2 Allergenen aus *B. microplus*-Larvenextrakten erbrachte die indirekte Hämagglutination (WILLADSEN und Mitarb., 1978) bei Tieren mit deutlicher Resistenz auch hohe Antikörpertiter. Im Gegensatz dazu konnte RIEK (1962) weder in der Hämagglutination, noch mit KBR und Geldiffusion Ergebnisse erzielen, die auf zirkulierende Antikörper gegen *B. microplus* schließen ließen.

Nach Injektion von Mitteldarm und Reproduktionsorganen gesogener *Dermacentor andersoni*-Adulten beobachteten ALLEN und HUMPHREYS (1979) eine deutliche Antikörperbildung. Seren geimpfter Tiere zeigten in der Immundiffusion mehrere Banden.

Dasselbe System verwendeten WIKEL und OSBURN (1982), welche Rinder viermal mit *Dermacentor andersoni*-Adulten infestierten. Die im 1. und 2. Besatz nachgewiesenen Antikörper verschwanden nach dem 3. und 4. Besatz. Die Autoren vermuteten, daß der Speichel von *D. andersoni* immunsuppressive Bestandteile habe. Ein Absinken des Antikörperspiegels nach Mehrfachbesatz mit *D. andersoni* bestätigten WHELEN und Mitarb. (1984); sie hatten im ELISA einen Titeranstieg nach Zweitbesatz und daraufhin ein Abfallen festgestellt.

WHELEN und Mitarb. (1984) wiesen auch im Wirtssystem *Amblyomma americanum* - Rind mit dem ELISA Antikörper nach, während dies MCGOWAN und Mitarb. (1981) mit der indirekten Hämagglutination nicht gelang.

Bei serologischen Untersuchungen mit dem ELISA zeigte ROSENBERG (1984), daß Rinder nach Besatz mit *R. appendiculatus*- und *H. a. excavatum*-Adulten Antikörper bildeten. Dabei verstärkte ein Mehrfachbesatz die Antikörperbildung im Sinne eines Boostereffektes; 1-2 Monate nach der letzten Infestation sanken die Titer wieder ab. *A. variegatum*-Adulte erbrachten bereits nach 14 Tagen Maximaltiter, Mehrfachbesätze jedoch keine Steigerung der Antikörperproduktion. Die Titer blieben bei *A. variegatum* deutlich unter denen der mit *R. appendiculatus* und mit *H. a. excavatum* infestierten Tiere, sie persistierten aber dafür länger.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Als Infestationsmaterial verwendete ich Adulte der Gattungen *Hyalomma anatolicum excavatum* und *Amblyomma variegatum*, die zum Zeitpunkt des ersten Ansatzes ein Alter von 1-8 Monaten hatten. Die Züchtung der Präimaginalstadien erfolgte auf Kaninchen; die Adulten hielt ich in Rollrandgläsern (43 mm Höhe, 30 mm Innendurchmesser), die mit Zellstoffstopfen verschlossen wurden. Optimale Bedingungen für die Zecken herrschen bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85-90% und einer Temperatur von 28° C.

Als Wirtstiere für den Ansatz der Zecken standen mir schwarz-bunte Kälber im Alter von 6-8 Monaten zur Verfügung, die vorher noch keinen Kontakt mit den verwendeten Zeckenspezies gehabt hatten. Die Tiere wurden einzeln in Langständen mit Stroh-einstreu aufgestellt. Um zu verhindern, daß die Kälber die auf dem Rücken befestigten Zeckenbeutel zerstörten, wurden sie mit zwei Stricken am Kopf so fixiert, daß sie ihren Rücken nicht erreichen konnten. Die Fütterung erfolgte mit Heu (2 x täglich), Kälberkorn SP und Haferflocken (1 x täglich). Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Für die Versuche mit Amblyomma variegatum verwendete ich die Rinder Nr. 7, 8 und 9. Am Tag vor dem ersten Ansatz schor ich das Haar am Rücken der Tiere und entfettete die Haut mit Äther. Anschließend klebte ich mit Kontaktkleber 10 (Firma 3M) Baumwollmanschetten (Innendurchmesser 10 cm, Höhe 20 cm, 4 cm Kleberand) auf. Am folgenden Tag wurden mit einer Plastikspritze 50 männliche Zecken, 3 Tage später 50 weibliche Zecken pro Tier in die Beutel gebracht und diese mit einem Gummiring verschlossen. Die Männchen von *Amblyomma variegatum* müssen einige Tage saugen, um für die Weibchen attraktiv zu werden (CENTURIER und KLIMA, 1978). Es wurden 4 Ansätze durchgeführt, wo-

bei die Intervalle zwischen den Ansätzen 14 Tage betrug.

Der Ansatz der Hyalomma anatolicum excavatum-Adulten erfolgte auf den Rindern Nr. 4, 5, 6 (4 Ansätze, Probenentnahme im 3. und 4. Ansatz) und auf den Rindern Nr. 10 und 11 (2 Ansätze, Probenentnahme im 1. und 2. Ansatz). Es wurden jeweils 100 Paare verwendet, wobei hier die Männchen und Weibchen gleichzeitig angesetzt werden konnten. Ansonsten verfuhr ich in gleicher Weise, wie oben bei Amblyomma variegatum beschrieben.

Die Hautbiopsien entnahm ich vor dem Ansatz sowie 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach dem Ansaugen der Zecken mittels einer Drillstanze (Hauptner, 3 mm Durchmesser). Die auftretende Blutung wurde durch kurzes Aufdrücken steriler Gaze gestillt. Von den entnommenen zwei Proben wurde die erste in 10%igem neutralem Formalin, die zweite in einem Gemisch aus 10%igem Formalin und 96%igem Äthanol (Verhältnis 1:4) fixiert, wie dies MBEMBA (1983) bei ähnlichen Untersuchungen an Schafen durchgeführt hatte.

Zur Einbettung in Paraplast wurden die Proben zuerst in Plastikkassetten (Unikassette White der Miles Laboratories Ltd.) verbracht und 24 Stunden fließend gewässert, um das Fixierungsmittel zu entfernen. Anschließend folgten die Entwässerung (24 Stunden in 50% Äthanol, je 12 Stunden in 70%, 80% und 96% Äthanol und 12 Stunden in Isopropanol), die Entfernung des Alkohols und der Wasserreste (12 Stunden in Methylbenzoat), daraufhin die Methylbenzoatentfernung (20 Minuten bei 30-40° C in einer gesättigten Lösung von Paraplast und Benzol). Zur völligen Durchtränkung der Proben mit dem Einbettungsmaterial Paraplast legte ich die Biopsien zuerst für 20 Minuten in unreines, anschließend für 24 Stunden in reines flüssiges Paraplast (Temperatur 56-59° C) ein. Zum Einbetten der Proben verwendete ich Gießbrähmchen, die nach

dem Erkalten der Paraplastmasse bei einer Temperatur von -18° C direkt in das Mikrotom eingespannt werden können (Firma Shandon: Tims-Gießrähmchen: 25 mm x 25 mm Fläche, 10 mm Tiefe, Einbettrahmen mit aufgesetztem Gießboden und perforierter Kapseldecke: 25 mm x 25 mm Fläche, 15 mm Tiefe, Gießformeinsatz für kleine Gewebeteile).

Mit dem Schlittenmikrotom (Firma Leitz 24644, biplanes Mikrotommesser Typ C) fertigte ich ca. 8 µm dicke Schnitte an, die auf einem mit Glyceringelatine und Aqua dest. befeuchteten Objektträger bei 48° C auf einem Heiztisch gestreckt wurden. Vor der Färbung stellte ich die Schnitte in Stahlfärbegestellten 2 Stunden bei 56-59° C in den Brutschrank.

Ich führte 2 Färbungen durch:

- a) die Toluidinblaufärbung zum Nachweis der Mastzellen; Mastzellgranula färben sich selektiv rot-violett an
- b) die Hämalaun-Eosin-Färbung, die eine Kern-Plasmafärbung darstellt; hier färben sich die Kerne der Zellen blauviolett, das Cytoplasma, insbesondere Granula von eosinophilen Granulozyten dagegen rot.

Färberezepte

a) Toluidinblaufärbung:

- Entparaffinieren der Schnitte: 2x5 Minuten in Xylol, je 2 Minuten in Isopropanol und 96% Äthanol, je 1 Minute in 80% und 70% Äthanol, dann kurzes Eintauchen in Aqua dest.
- Einstellen der Schnitte in eine 0,01% wäßrige Toluidinblaulösung für 8 Minuten
- Kurzes Abwaschen in Leitungswasser
- Entwässern in je 2 Portionen 96% Äthanol und Isopropanol (je 2 Minuten)
- Einstellen der Schnitte in Xylol (2x5 Minuten)

b) Hämalaun-Eosin-Färbung:

- Entparaffinieren der Schnitte: 2x5 Minuten in Xylol, je 2 Minuten in Isopropanol und 96% Äthanol, je 1 Minute in 80% und 70% Äthanol, dann kurzes Eintauchen in Aqua dest.
- Einstellen der Schnitte in Mayer's Hämalaun Lösung (Merck) für 15 Minuten
- Abspülen in Aqua dest.
- Einstellen der Schnitte in fließendes Leitungswasser für 15 Minuten
- Einstellen der Schnitte in 0,1% Eosinlösung für 10 Minuten
- Abspülen in Aqua dest.
- Entwässern in je 1 Portion 70% und 80% und je 2 Portionen 96% Äthanol und Isopropanol
- Einstellen der Schnitte in Xylol (2x5 Minuten)

Für die Toluidinblaufärbung verwendete ich Schnitte, die aus formalin-alkoholfixierten Proben hergestellt worden waren, für die Hämalaun-Eosin-Färbung dagegen Schnitte, die sowohl aus formalin- als auch aus formalin-alkoholfixierten Proben hergestellt worden waren. Nach dem Färben wurden die Schnitte mit Deckgläsern (24 mm x 60 mm) und Eukitt eingedeckt.

Für die Auswertung der histologischen Schnitte verwendete ich ein Lichtmikroskop der Firma Leitz mit einer 400fachen Vergrößerung (Ölimmersion) und Okularnetzplatte bzw. Okularmikrometer. Dabei untersuchte ich die Zementablagerung, auftretende Epidermisveränderungen sowie die zelluläre Reaktion im Korium bis 180 µm und 360-540 µm neben dem Stichkanal auf einer Fläche von 0,032 mm² an der Grenze zwischen Epidermis und Korium. Ich zählte und differenzierte die eingewanderten eosinophilen Granulozyten sowie die Mastzellen, die anhand ihrer selektiven Anfärbung eindeutig zu identifizieren waren.

B. Ergebnisse

I. Amblyomma variegatum

1. Zementablagerung

Das Hypostom von *A. variegatum* drang während des Saugaktes durch die Epidermis bis tief in die Pars reticularis des Koriums vor. Teilweise erreichte es sogar die Subkutis. Der sezernierte Zement umschloß das Hypostom im Korium schaftartig; der auf der Epidermis abgelagerte Zement stellte eine Verlängerung dieses Schaftes dar (Abb. 1).



Abb. 1: Übersichtsaufnahme des Stichkanals von *Amblyomma variegatum* 24 Stunden nach dem 2. Ansatz. HE-Färbung. H=Hypostom, ZK=Zementanteil im Korium, ZE=Zementanteil auf der Epidermis.

Auf Längsschnitten drückten sich die Zähnchen des Hypostoms deutlich sichtbar an der dem Lumen des Stichkanals zugewandten Seite des Zements ab. Die Außenseite des durch den Zement gebildeten Rohres erhielt durch das Eindringen von Zement zwischen die umgebenden Kollagenfasern eine wellenartige Abgrenzung. Von der Epidermis in Richtung auf das Korium nahm der Zement an Dicke zu.

In der HE-Färbung reagierte der ins Korium sezernierte Zement eosinophil, während die auf der Epidermis direkt neben der Einstichstelle sichtbaren Anteile basophile Eigenschaften zeigten. In dieser bläulich-gefärbten Masse fielen Reste von Haarquerschnitten auf (Abb. 1).

Unabhängig von der Zahl der Ansätze nahm die Zementstärke (gemessen an der dicksten Stelle in Längsschnitten) nur mit der Dauer des Saugaktes zu. So betrug die durchschnittliche Dicke nach 6 Stunden 81, nach 96 Stunden 192 μm .

2. Epidermisveränderungen

Die durch *A. variegatum* verursachten Veränderungen der Epidermis waren in allen 4 Ansätzen bei den 3 Rindern vergleichbar. Sie konzentrierten sich auf die unmittelbare Umgebung der Einstichstelle ($\sim 180 \mu\text{m}$ neben dem Stichkanal). Innerhalb der ersten 24 Stunden trat eine deutliche Abflachung der Epidermis neben der Penetrationsstelle auf. Diese Abflachung, die mit verstärkter Eosinophilie der Zellen einherging, steigerte sich nach 48 Stunden; die Epidermis wurde nekrotisch (Abb. 2). Nach 72 bzw. 96 Stunden erschien die Epidermis neben der Einstichstelle wie ausgestanzt. An ihre Stelle trat die von Haarresten durchsetzte blaue Zementmasse.

Zu keinem Zeitpunkt während der 4 Ansätze kam es zu einer leukozytären Infiltration, zu Blasenbildung oder Hämorrhagien in der Epidermis. Die Grenze zwischen Epidermis und Korium blieb immer deutlich erhalten.



Abb. 2: Übersichtsaufnahme des Stichkanals von *Amblyomma variegatum* 48 Stunden nach dem 1. Ansatz. HE-Färbung.
Die Epidermis neben der Einstichstelle ist nekrotisch.

3. Veränderungen im Korium

Um die zellulären Reaktionen im Korium zu untersuchen, zählte und differenzierte ich die in unmittelbarer Umgebung des Stichkanals eingewanderten Zellen (Zone I: 0-180 µm neben dem Stichkanal an der Grenze zwischen Epidermis und Korium gelegen, Fläche 0,032 mm²) sowie die Zellen in der näheren Umgebung (Zone II: 360-540 µm neben dem Stichkanal an der Grenze zwischen Epidermis und Korium gelegen, Fläche 0,032 mm²). Ich erfaßte die durch die HE-Färbung anhand ihrer ro-

ten Granula deutlich identifizierbaren eosinophilen Granulozyten sowie die Mastzellen, deren Granula durch Toluidinblau rot bis violett angefärbt werden. Auf die Zählung und Differenzierung mononukleärer Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten etc.) verzichtete ich, da sie nicht eindeutig zu unterscheiden waren. Die genannten Zellzahlen beziehen sich auf Mittelwerte von den 3 verwendeten Rindern Nr. 7, 8 und 9.

In der Zone I kam es in keinem der 4 Ansätze zu einer nennenswerten Eosinophileninfiltration. Vor dem 1. Ansatz waren 1,9 Eosinophile/0,032 mm² vorhanden. Die Eosinophilenzahlen blieben auch nach Zeckenansatz niedrig, Maximalwerte stellten 0,33 Eosinophile/0,032 mm² nach 12 Stunden im 2. Ansatz sowie 0,47 Eosinophile/0,032 mm² im 3. Ansatz dar.

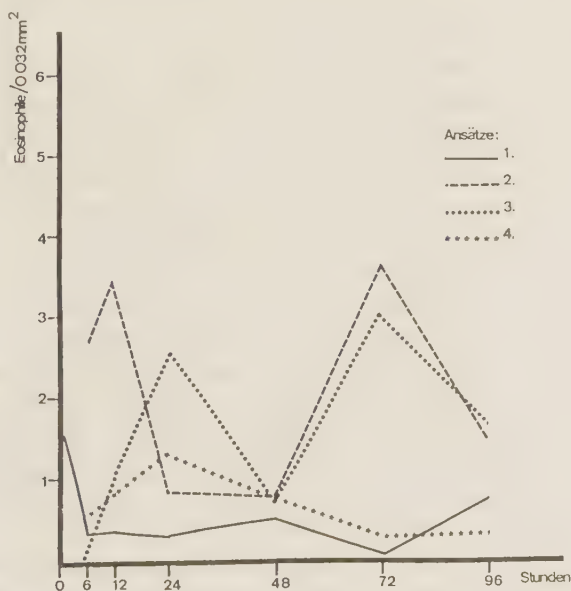


Abb. 3: Infiltration von eosinophilen Granulozyten im Korium des Rindes während 4 Besätzen mit *Amblyomma variegatum* 360-540 µm neben der Einstichstelle.

In der Zone II blieben die Werte im 1. Ansatz vergleichbar niedrig (Maximum 0,8 Eosinophile/0,032 mm²). Im 2. und 3. Ansatz wanderten Eosinophile schubweise in die Umgebung der Einstichstelle ein. Maximalwerte wurden jeweils nach 12-24 Stunden und nach 72 Stunden gemessen (3,6 im 2. Ansatz bzw. 3,0 Eosinophile/0,032 mm² im 3. Ansatz). Im 4. Ansatz war der höchste Wert mit 1,3 Eosinophilen/0,032 mm² nach 24 Stunden erreicht, danach sank die Zahl wieder (Abb. 3).

Das Verhalten der Mastzellen ähnelte sich in der Zone I und der Zone II während allen 4 Ansätzen sehr stark. In Zone II wanderten, vergleichbar dem Verhalten der eosinophilen Granulozyten, allerdings relativ mehr Mastzellen ein als in Zone I.

Vor Infestation waren 4,3 Mastzellen/0,032 mm² im Korium vorhanden. Nach 6 Stunden trat im 1., 2. und 4. Ansatz eine Verminderung der Anzahl der Mastzellen ein (Zone I: im 1. Ansatz auf 1,0, im 2. Ansatz auf 1,6, im 4. Ansatz auf 1,9 Mastzellen/0,032 mm²). Danach näherte sich die Zahl wieder dem Wert vor Besatz. Im Zeitraum zwischen 12 und 48 Stunden wanderten nur wenige Mastzellen neu ein. Maximalwerte wurden in Zone I mit 2,8 nach 24 Stunden im 1. Ansatz, mit 4,8 nach 24 Stunden im 2. Ansatz bzw. mit 5,2 Mastzellen/0,032 mm² nach 48 Stunden im 4. Ansatz erreicht. Nach 48 Stunden verringerte sich die Zahl der Mastzellen auf Werte unter 1. Im 3. Ansatz zeigten die Mastzellen ein anderes Verhalten. Ihre Zahl nahm kontinuierlich von 5,9 Mastzellen/0,032 mm² in der Zone I auf 0,5 Mastzellen/0,032 mm² nach 96 Stunden ab, jedoch kam es auch hier zu keiner völligen Degranulation (Abb. 4).

Die Gefäße im Korium wiesen bei allen Besätzen ähnliche Veränderungen auf. Die Endothelien der Kapillaren in der Pars papillaris zeigten Schwellungen. In der Pars reticularis traten neben den Gefäßen vermehrt neutrophile und auch vereinzelt eosinophile Granulozyten auf.

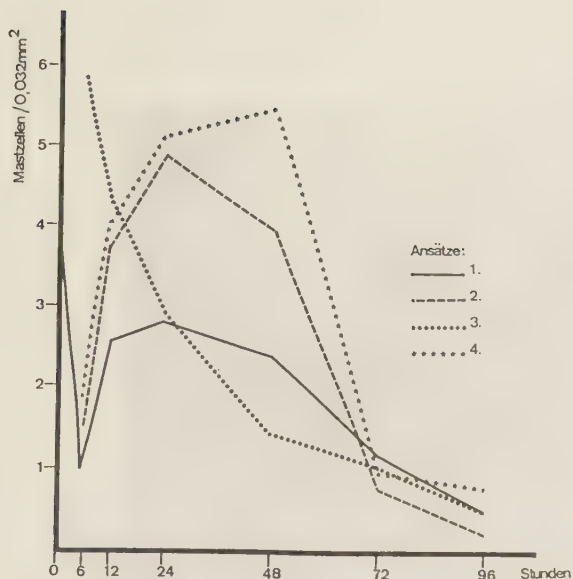


Abb. 4: Verhalten der Mastzellen im Korium des Rindes während 4 Besätzen mit *Amblyomma variegatum* 0-180 µm neben der Einstichstelle.

Die Kollagenfasern in der unmittelbaren Umgebung des Zements zeigten zu späten Zeitpunkten des Saugaktes bei der HE-Färbung eine verstärkte Basophilie.

An der Stelle, an der das Hypostom den Zement durchdringt, sammelten sich vermehrt neutrophile Granulozyten an. In nur wenigen Fällen zeigte sich unter dem Zement eine Höhlenbildung, die auf ein Fehlen von Kollagen hinweist. Diese Höhle war mit fädigem Material und neutrophilen Granulozyten gefüllt (Abb. 5).

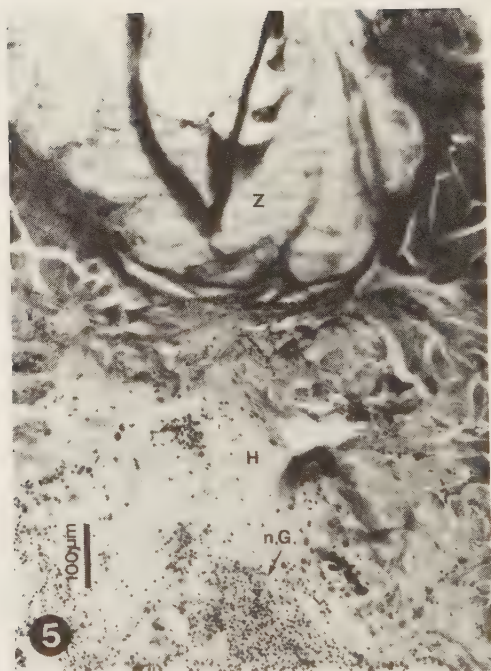


Abb. 5: Höhlenbildung unter dem Hypostom von *Amblyomma variegatum* 48 Stunden nach dem 2. Ansatz. HE-Färbung.

Z=Zement, H=Höhle, n.G.=neutrophile Granulozyten.

II. Hyalomma anatolicum excavatum

1. Zementablagerung

Das Hypostom von *H. a. excavatum* drang beim Saugakt durch die Epidermis bis in die Pars reticularis des Koriums ein. Der von der Zecke sezernierte Zement umschloß das Hypostom schaftartig, wobei die Zähnnchen des Hypostoms deutliche Abdrücke an der Innenseite des Zements hinterließen. Der Zement drang in den tieferen Schichten des Koriums zwischen die Kollagenbündel ein, sodaß bei Längsschnitten eine Dickenzunahme des Zements von der Epidermis in Richtung auf das Korium zu auffiel (Abb. 6). Zu allen Zeitpunkten des Besatzes erschien der Zement unten geöffnet.

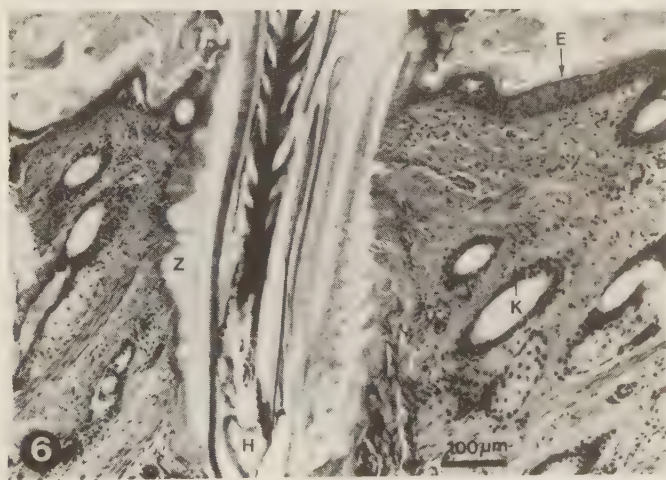


Abb. 6: Übersichtsaufnahme des Stichkanals von *Hyalomma anatolicum excavatum* 24 Stunden nach dem 1. Ansatz. HE-Färbung. H=Hypostom, E=Epidermis, K=Korium, Z=Zement.

Die Anteile des Zements, die ins Korium ausgeschieden werden,

färbten sich in der HE-Färbung homogen blaß-rosa an, während Anteile, die als Verlängerung des Zementschaftes auf der Epidermis abgelagert werden, hellblau erschienen. Diese basophile Masse war weniger homogen und von bräunlichen Einlagerungen durchzogen.

Die Menge des abgesonderten Zements nahm mit Dauer der Saugzeit zu. Die Zahl der Ansätze hatte keinen Einfluß auf die Menge. Die maximale Dicke der den Stichkanal auskleidenden Zementmasse (gemessen an Längsschnitten) betrug nach 6 Stunden durchschnittlich 38 μm , steigerte sich dann auf 47 μm nach 12 Stunden. Eine weitere Dickenzunahme erfolgte mit 78 μm erst nach 48 Stunden. Nach 72 Stunden waren Werte von 109 μm erreicht, die auch nach 96 Stunden nicht überschritten wurden.

2. Epidermisveränderungen

Die Epidermis zeigte bei allen Tieren vor Zeckeninfestation keine Veränderungen, jegliche leukozytäre Infiltration fehlte. Während des 1. Ansatzes kam es, abgesehen von einer geringgradigen Abflachung der Epidermis neben der Einstichstelle, innerhalb der ersten 48 Stunden zu keinerlei lichtmikroskopisch faßbaren Veränderungen (Abb. 6). Nach 48 Stunden (Rind 11) bzw. nach 72 Stunden (Rind 10) war die Grenze zwischen Epidermis und Korium neben dem Stichkanal 180 μm weit nicht mehr feststellbar. An ihre Stelle trat eine Zelldetritusmasse, in der teilweise noch intakte eosinophile und neutrophile Granulozyten sichtbar waren. In ca. 720 μm Entfernung von der Einstichstelle war die Epidermis vakuolisiert, neutrophile Granulozyten waren eingewandert und Serum in die Bläschen hinein ausgetreten. Nach 72 Stunden (Rind 11) bzw. 96 Stunden (Rind 10) war der Zelluntergang soweit fortgeschritten, daß nur noch nekrotische Massen neben dem Stichkanal erkennbar waren. In einiger Entfernung (ca. 360 μm) begann die Epidermis neu, war jedoch von Leukozyten infiltriert und blasig verändert.

Auch im 2. Ansatz war die Epidermis nach 6 Stunden neben dem Stichkanal abgeflacht, ca. 360 μm neben der Einstichstelle jedoch traten Lücken im Zellverband auf. Bereits 12 Stunden nach Saugbeginn war bei Rind 10 der Übergang der Epidermis ins Korium nicht mehr abgrenzbar, sondern völlig durch eosinophile und neutrophile Granulozyten ersetzt (Abb. 7).

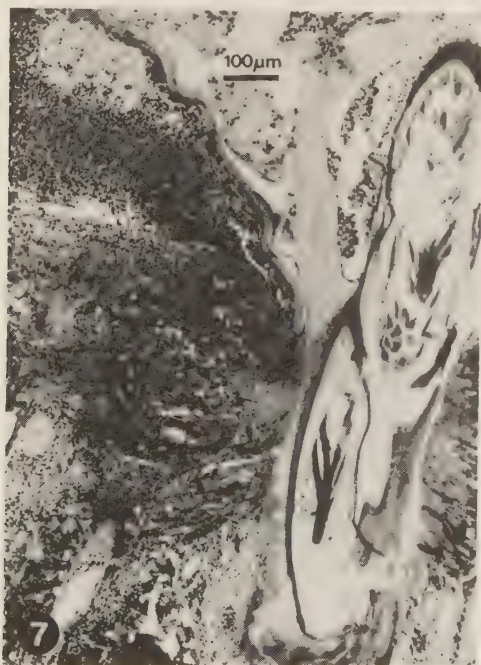


Abb. 7: Epidermisveränderung beim Rind 12 Stunden nach dem 2. Ansatz von *Hyalomma anatolicum excavatum*. HE-Färbung. Die Grenze zwischen Epidermis und Korium erscheint aufgehoben und durch eosinophile und neutrophile Granulozyten ersetzt.

In ca. 360 μm Entfernung waren Epidermis und Korium wieder deutlich zu unterscheiden. Die Epidermis enthielt hier Blasen, die mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten gefüllt waren (Abb. 8).

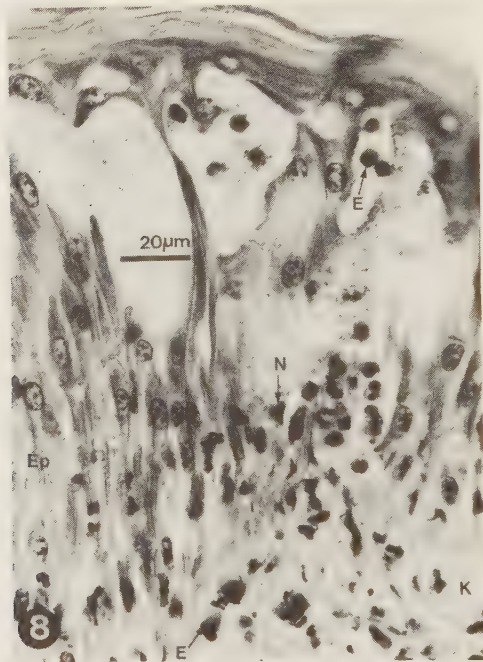


Abb. 8: Epidermisveränderung beim Rind 12 Stunden nach dem 2. Ansatz von *Hyalomma anatolicum excavatum*. HE-Färbung. K=Korium, Ep.=Epidermis, E=eosinophiler Granulozyt, N=neutrophiler Granulozyt

Nach 24 Stunden waren die nach 12 Stunden diagnostizierten Veränderungen verstärkt ausgebildet. Sie mündeten in einen Zelluntergang mit anschließender Nekrose ein (72 und 96 Stunden). Rind 11 zeigte eine vergleichbar starke Aufhebung der Grenze zwischen Epidermis und Korium erst nach 48 Stunden. Bis dahin

trat lediglich Serum zwischen die Epidermiszellen aus. Auch hier verfiel die Epidermis nach 72 und 96 Stunden neben der Einstichstelle der totalen Nekrose.

Im 3. Ansatz reagierten die Rinder 4, 5 und 6 alle sehr ähnlich. Nach 6 Stunden war die Epidermis in 360 μm Entfernung aufgelockert und von einigen Granulozyten durchsetzt. Bereits nach 12 Stunden war bei allen Tieren die Grenze zwischen Epidermis und Korium bis in eine Entfernung von 540 μm neben dem Stichkanal aufgehoben, danach begann die Epidermis wieder, war aber von Blasen durchsetzt (Abb. 9).

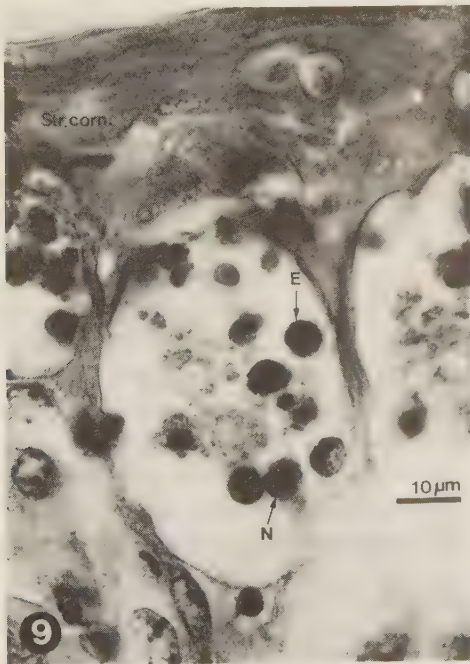


Abb. 9: Epidermisveränderung beim Rind 12 Stunden nach dem 3. Ansatz von *Hyalomma anatolicum excavatum*. HE-Färbung. Str. corn.=Stratum corneum, E=eosinophiler Granulozyt, N=neutrophiler Granulozyt.

Bei Rind 5 kamen nach 24 Stunden, bei Rind 6 nach 48 Stunden Mikrohämorrhagien in die Epidermis hinzu. Bereits nach 48 Stunden war die Umgebung des Stichkanals bei allen 3 Rindern nekrotisch verändert.

Im 4. Ansatz zeigte Rind 5 bereits nach 6 Stunden Mikrovesikel, die Neutrophile enthielten, während bei den anderen Rindern die Epidermis neben der Einstichstelle lediglich abgeflacht war. Nach 12 Stunden traten sowohl bei Rind 4 als auch Rind 5 Mikrohämorrhagien in die Epidermis hinzu. Nach 24 Stunden war die Epidermis-Korium-Grenze wieder aufgehoben, nach 48 Stunden war die Umgebung des Stichkanals bei allen 3 Rindern nekrotisch verändert. Nach 360-540 μm fing die Epidermis wieder an, war anfangs von neutrophilen Granulozyten durchsetzt, später wieder intakt.

3. Veränderungen im Korium

Um die zelluläre Infiltration, die durch den Saugakt von *H. a. excavatum* ausgelöst wird, zu untersuchen, verfuhr ich, wie bei *A. variegatum* beschrieben. Durch die Auflösung der Grenze zwischen Epidermis und Korium, die nach Reinfestation immer früher eintrat, war es ab diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich, eingewanderte Zellen in den definierten Zonen I (0-180 μm neben der Einstichstelle an der Grenze zwischen Epidermis und Korium gelegen, Fläche 0,032 mm^2) und II (360-540 μm neben der Einstichstelle an der Grenze zwischen Epidermis und Korium gelegen, Fläche 0,032 mm^2) zu zählen. Die Grenze war dann jeweils völlig durch eosinophile und neutrophile Granulozyten ersetzt, die im weiteren Verlauf dem Zelluntergang verfielen.

Die unten genannten Zellzahlen stellen Mittelwerte dar (1. und 2. Ansatz: Rind 10 und 11, 3. und 4. Ansatz: Rind 4, 5 und 6). Vor dem 1. Ansatz waren auf einer Fläche von 0,032 mm^2 durchschnittlich 1,9 Eosinophile und 4,3 Mastzellen vorhanden.

In der direkten Umgebung der Einstichstelle wanderten während des 2., 3. und 4. Ansatzes deutlich mehr eosinophile Granulozyten ein als nach der 1. Infestation. Im 1. Ansatz wurden nach 24 Stunden 0,3 Eosinophile/0,032 mm² gezählt, während im 2. Ansatz bereits nach 6 Stunden 8,2 Eosinophile/0,032 mm² vorhanden waren. Im 3. Ansatz wurde der Maximalwert nach 12 Stunden mit 10 Eosinophilen/0,032 mm², im 4. Ansatz nach 24 Stunden mit 6 Eosinophilen/0,032 mm² erreicht (Abb. 10). Diese verstärkte Eosinophileninfiltration hatte immer eine anschließende Aufhebung der Grenze zwischen Epidermis und Korium zur Folge.

In 360-540 µm Entfernung von der Einstichstelle (Zone II) wanderten weniger eosinophile Granulozyten ein als in der unmittelbaren Umgebung. Die stärkste Infiltration trat hier jeweils nach 24 Stunden (im 1. Ansatz 3,2, im 2. Ansatz 9,7, im 4. Ansatz 2,3 Eosinophile/0,032 mm²) bzw. im 3. Ansatz bereits nach 12 Stunden mit 4,0 Eosinophilen/0,032 mm² auf. Danach sanken die Zahlen wieder ab, lediglich im 1. Ansatz wanderten nach 72 Stunden erneut eosinophile Granulozyten ein (Abb. 11).

Die Mastzellen verhielten sich in Zone I und Zone II ähnlich, jedoch waren die Reaktionen in nächster Umgebung des Stichkanals ausgeprägter.

Während des 1. Ansatzes wanderten vermehrt Mastzellen in die Umgebung der Einstichstelle ein. Ihre Zahl stieg von 4,3 vor dem 1. Besatz auf 12,1/0,032 mm² nach 24 Stunden. Im Gegensatz dazu kam es nach Reinfestation von Ansatz zu Ansatz zu einer beschleunigten Abnahme der nachweisbaren Mastzellen. So waren im 2. Ansatz nach 6 Stunden noch 3,8, im 3. Ansatz bereits nur noch 0,8 Mastzellen/0,032 mm², im 4. Ansatz dagegen keine Mastzellen mehr vorhanden. Im 4. Ansatz wanderten 12 Stunden nach Saugbeginn erneut Mastzellen ein (Abb. 10).

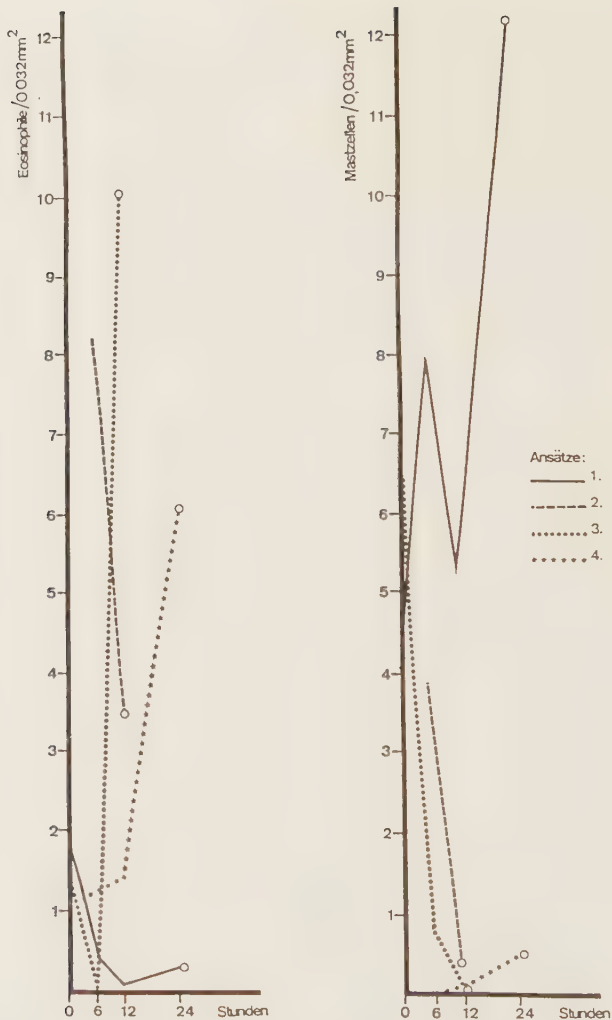


Abb. 10: Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen im Korium des Rindes 0-180 μ m neben der Einstichstelle während 4 Besätzen mit *Hyalomma anatolicum excavatum*. o = Aufhebung der Epidermis-Korium-Grenze.

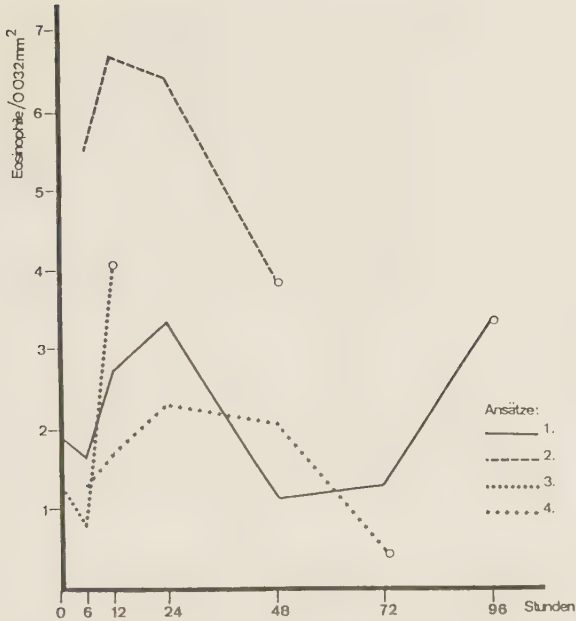


Abb. 11: Infiltration von eosinophilen Granulozyten im Korium des Rindes 360-540 μm neben der Einstichstelle während 4 Besätzen mit *Hyalomma anatolicum excavatum*
o = Aufhebung der Epidermis-Korium-Grenze.

In der Zone II kam es im 1. Ansatz ebenfalls zu einer starken Mastzellinfiltration. Nach 48 Stunden wurde mit 11,2 Mastzellen/0,032 mm^2 hier ein Maximum erreicht, danach sank die Zahl auf 5,5 Mastzellen/0,032 mm^2 nach 96 Stunden.

Im 2., 3. und 4. Ansatz sanken die Werte wie in Zone I nach 6 Stunden kontinuierlich ab, im 2. Ansatz von 9,3 auf 1,3 nach 48 Stunden, im 3. Ansatz von 6,2 auf 4,0 nach 12 Stunden, im 4. Ansatz von 5,4 auf 0,9 Mastzellen/0,032 mm^2 nach 48 Stunden (Abb. 12).

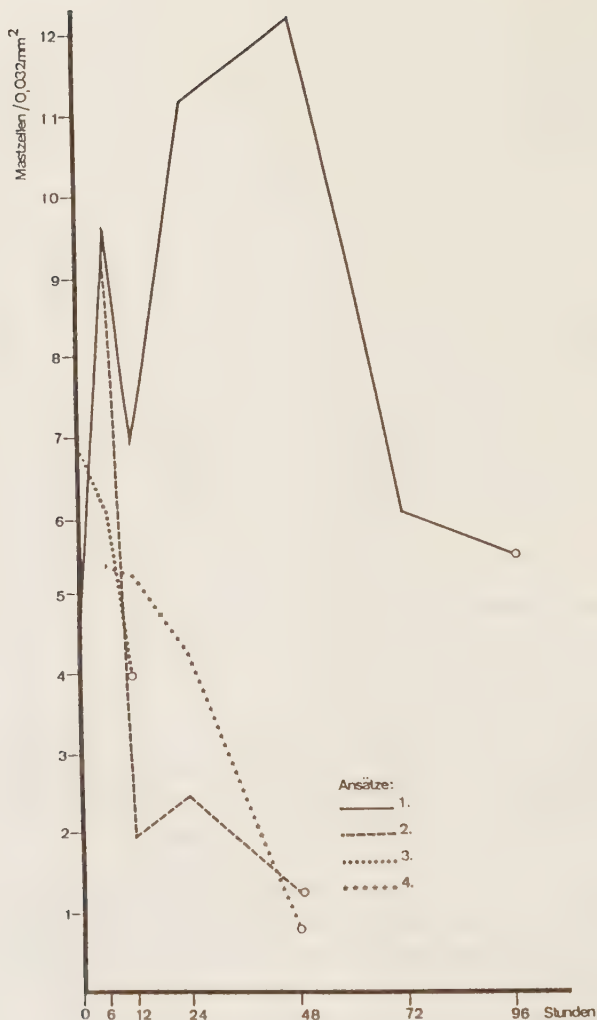


Abb. 12: Infiltration von Mastzellen im Korium des Rindes 360-540 μ m neben der Einstichstelle während 4 Besätzen mit *Hyalomma anatolicum excavatum*
 o = Aufhebung der Epidermis-Korium-Grenze

Die durch den Saugakt von H. a. excavatum ausgelösten Gefäßveränderungen betrafen sowohl die Kapillaren in der Pars papillaris des Koriums als auch die Gefäße in der Pars reticularis. Während die Kapillaren Endothelschwellungen aufwiesen, zeigten sich an den tiefen Gefäßen perivaskuläre Leukozyteninfiltrate. Die deutlich sichtbaren Lumina waren mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten gefüllt.

Eine Höhlenbildung unter dem Zement, die durch fehlendes Kollagen bedingt wäre, konnte ich nicht diagnostizieren.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Meine Untersuchungen bestätigten die Beobachtungen von MOORHOUSE (1973) und NORVAL (1975), daß das Hypostom von A. variegatum beim Saugakt bis in die Subkutis vordringt und von Zement schaftartig umschlossen wird. MOORHOUSE (1973) wies weiter darauf hin, daß nach Besatz mit Amblyomma-Arten die Epidermis intakt bleibt; so beschränkten sich die Veränderungen der Epidermis nach 4 Besätzen mit A. variegatum auf eine Abflachung mit anschließender Nekrose in der unmittelbaren Umgebung der Einstichstelle.

NORVAL (1975) berichtete, daß Longirostrata, zu denen A. variegatum auch gehört, wenig oder gar keinen Oberflächenzement ablagern. BOURDEAU (1982) stellte zusätzlich fest, daß sich im Korium der Zement seitlich stark ausdehnt. Dies deckt sich mit meinen Befunden.

Unter dem Zement wanderten neutrophile Granulozyten ein, auch kam es in manchen Fällen zu einer Höhlenbildung. TATCHELL und MOORHOUSE (1968) beobachteten ebenfalls eine Hohlraumbildung bei Rindern nach Besatz mit B. microplus, unabhängig davon, ob die Tiere bereits Kontakt mit Zecken hatten oder nicht.

Wie TATCHELL und MOORHOUSE (1969) diagnostizierten auch THEIS und BUDWIESER (1974) bei Hunden nach Infestation mit R. sanguineus eine durch neutrophile Granulozyten verursachte Auflösung des Kollagens unter den Mundwerkzeugen. In beiden Experimenten bildeten die Hunde keine Immunität gegen R. sanguineus aus. TATCHELL und MOORHOUSE (1969) wiesen andererseits nach, daß diese Hohlraumbildung unterblieb nach Applikation von Stickstofflost, der eine Neutropenie hervorruft.

BERENBERG, WARD und SONENSHINE (1972) stellten fest, daß der Zusatz von Speicheldrüsenantigen von D. variabilis zu Hundeserum eine unspezifische Komplementaktivierung auslöste, wobei C_5 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkte. Die

eingewanderten Neutrophilen unterhalten nach BOURDEAU (1982) durch Freisetzung von Enzymen die Entzündung. Sie traten speziell bei Wirten auf, die noch keinen Zeckenkontakt hatten. Auch BOURDEAU (1982) machte die Komplementaktivierung für die Infiltration von Neutrophilen verantwortlich.

Ebenfalls nur während des ersten Besatzes beobachteten ARTHUR (1973) im Wirtssystem *H. rufipes*/Kaninchen sowie BROWN, WORMS und ASKENASE (1983) im Modell *R. appendiculatus*/Meerschweinchen eine Höhlenbildung unter den Mundwerkzeugen. Das in meinen Versuchen festgestellte Auftreten von neutrophilen Granulozyten im Hohlraum unter dem Hypostom von *A. variegatum* scheint demnach nicht durch immunologische Vorgänge bedingt zu sein.

In allen 4 Ansätzen mit *A. variegatum* kam es innerhalb der ersten 6 Stunden sowohl in Zone I (0-180 μm neben der Einstichstelle an der Grenze zwischen Epidermis und Korium gelegen, Fläche 0,032 mm^2) als auch in Zone II (360-540 μm neben der Einstichstelle an der Grenze zwischen Epidermis und Korium gelegen, Fläche 0,032 mm^2) zu einem Absinken der Zahl der Mastzellen. Dies deutet auf eine Degranulation mit anschließender Histaminausschüttung hin. Nach SOTER und AUSTEN (1981) erfolgt eine anaphylaktische Degranulation der Mastzellen entweder vermittelt durch den Komplementanteil C_5 oder über den Kontakt von Antigen mit IgE-Antikörpern auf der Mastzelloberfläche.

ALLEN, DOUBE und KEMP (1977) vermuteten, daß der Zusammenbruch der Mastzellen nach Besatz von Rindern mit *I. holocyclus* keinen immunologischen Prozess darstellt, sondern rein mechanisch oder durch Bestandteile im Zeckenspeichel verursacht wurde. Dies bestätigten BINNINGTON und KEMP (1980); sie machten ebenfalls Speichelbestandteile für die Mastzelldegranulation und für eine erhöhte Gefäßpermeabilität verantwortlich.

Dagegen brachten RIEK (1962), SCHLEGER und Mitarb. (1976), TATCHELL und MOORHOUSE (1968) sowie BINTA und CUNNINGHAM (1984)

die Mastzelldegranulation mit einer allergischen Reaktion vom Soforttyp I in Zusammenhang. Eosinophile Granulozyten wandern nach ihrer Ansicht angezogen durch Histamin und ECF-A, welche bei der Degranulation frei werden, ein. BROWN, BARKER und ASKE-NASE (1984) glauben dagegen, daß die Eosinophilen stimuliert werden von ECF-A, das sowohl aus Mastzellen als auch im Rahmen der kutanen basophilen Hypersensitivität aus basophilen Granulozyten freigesetzt wird.

Nach Besatz mit *A. variegatum* erscheint das Fehlen von eosinophilen Granulozyten in der direkten Umgebung der Einstichstelle bei den eigenen Versuchen auffällig. Während keinem der 4 Ansätze kam es zu einer nennenswerten Eosinophileninfiltration. Dies kann sowohl auf eine Antihistaminikumwirkung des Zeckenspeichels als auch auf immunsuppressive Eigenschaften zurückzuführen sein.

CHINERY und AYITEY-SMITH (1977) wiesen im Speicheldrüsenhomogenat von *R. sanguineus* einen Bestandteil nach, der Histamin neutralisiert. Auch BOURDEAU (1982) vermerkte die histaminblockierende Wirkung des Zeckenspeichels. Durch eine mögliche Immunsuppression ließe sich, neben dem fehlenden Einwandern von eosinophilen Granulozyten direkt neben dem Stichkanal, auch erklären, daß 360 - 540 µm neben der Einstichstelle nach Zweitbesatz mehr eosinophile Granulozyten auftraten als im 1. Ansatz; im 3. und 4. Ansatz jedoch waren deutlich weniger eosinophile Granulozyten nachweisbar als im 2. Ansatz.

ROSENBERG (1984) vermutete, daß die niedrigen Antikörpertiter, die nach Mehrfachbesatz mit *A. variegatum* erreicht wurden, auf eine Immunsuppression zurückzuführen seien. In ihren Versuchen nahmen die Durchschnittsgewichte abgefallener Zeckenweibchen vom 1. zum 4. Ansatz zu; die Rinder bildeten keine Immunität gegen *A. variegatum* aus. Eine Erniedrigung der Antikörpertiter stellten WHELEN und Mitarb. (1984) sowie WIKEL und OSBURN (1982) nach Mehrfachbesatz von Rindern mit *D. andersoni* fest.

Letzere wiesen bei in vitro Versuchen nach, daß die Ansprechbarkeit von T-Lymphozyten auf Phytohämagglutin, einem Stoff, der die Mitose dieser Population steigert, nach wiederholter Infestation der Rinder mit *D. andersoni* abnimmt. Sie folgerten daraus, daß Speichelbestandteile von *D. andersoni* immunsuppressiv wirken. WIKEL (1982) hatte dasselbe Phänomen auch bei Experimenten mit Meerschweinchen und *D. andersoni*-Adulten beobachtet. Nach seiner Ansicht ist die Zecke in der Lage, die T-Lymphozytenabwehr des Wirtes zu unterlaufen.

NORVAL (1975) stellte fest, daß Zecken mit langen Mundwerkzeugen allgemein weniger anfällig für die Wirtsabwehr sind als solche mit kurzen Mundwerkzeugen. So konnten *Amblyomma*-Arten 2 Jahre lang auf Kaninchen saugen, ohne daß diese eine Immunität ausbildeten. Auch bei Schafen trat nach Mehrfachbesatz mit *A. hebraeum* keine Verminderung der Zahl saugender Zecken ein (NORVAL, 1978). Im Gegensatz dazu sank das Gewicht von *A. variegatum*- sowie von *A. hebraeum*-Nymphen, die an Meerschweinchen saugten, nach dem 2. Ansatz (HELLER-HAUPT, VARMA und LANGI, 1981). THEIS und BUDWIESER (1974) warnten angesichts der unterschiedlichen Reaktionen verschiedener Wirte auf die selbe Zeckenart vor Verallgemeinerungen. Während NORVAL (1975 und 1978) und HELLER-HAUPT, VARMA und LANGI (1981) lediglich die biologischen Auswirkungen nach Besatz mit *Amblyomma*-Arten beschrieben, gingen THEIS und BUDWIESER (1974) zusätzlich auf die histologischen Veränderungen ein; diese bestanden nur in einer Höhlenbildung unter den Mundwerkzeugen und in der Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Wie in meinen Ergebnissen fehlten eosinophile Granulozyten in der Umgebung des Stichkanals völlig.

ALLEN, DOUBE und KEMP (1977), insbesondere aber BROWN, BARKER und ASKENASE (1984) sahen basophile Granulozyten als Effektorzellen in der Immunantwort des Rindes gegen Schildzecken an. Zum Nachweis dieser Zellen im Gewebe wären spezielle Einbettungs- und Färbemethoden nötig gewesen, da sich die Granula

sonst nicht anfärben (DVORAK und Mitarb. 1970). Zu den typischen Veränderungen einer durch basophile Granulozyten vermittelten kutanen basophilen Hypersensitivität gehört eine Spongiose der Epidermis, welche sich zur Blasenbildung steigert. Sie tritt insbesondere über Basophilenansammlungen im Korium auf (ALLEN, DOUBE und KEMP, 1977; BROWN, BARKER und ASKENASE, 1984). In keinem Fall kam es während der 4 Ansätze von *A. variegatum* an unseren Versuchsrindern zu einer histologisch nachweisbaren Blasenbildung in der Epidermis.

ROSENBERG (1984) erreichte beim Intrakutantest Sofortreaktionen mit Speicheldrüsenantigenen von *A. variegatum*-Adulten, die 48 Stunden, 2-5 Tage und 6-8 Tage gesaugt hatten. Ich konnte histologisch 48 Stunden nach Saugbeginn im 1., 2. und 4. Ansatz eine erneute Degranulation der Mastzellen feststellen; im 3. Ansatz lief dagegen die Degranulation kontinuierlich ab. Der Freisetzung von Histamin folgte eine Infiltration von Eosinophilen nach 72 Stunden; allerdings blieb diese auf die weitere Umgebung der Einstichstelle beschränkt. Möglicherweise werden beim Saugakt zu diesem Zeitpunkt Substanzen frei, die zu einer Mastzelldegranulation führen. Die zeitliche Übereinstimmung kann aber auch nur scheinbar sein; denn bei der Gewinnung von Speicheldrüsenantigen wurden Homogenate der gesamten Speicheldrüse verwendet und somit beim Intrakutantest eventuell Bestandteile der Speicheldrüsen injiziert, die beim natürlichen Saugakt nicht freigesetzt werden.

Wie nach Besatz mit *A. variegatum* drang das Hypostom von H. a. excavatum bis tief ins Korium ein und wurde von Zement schaftartig umschlossen. Dieselben Beobachtungen machte ARTHUR (1973) nach Besatz von Kaninchen mit *H. rufipes*-Larven und -Nymphen. Er betonte, daß der Zement schubweise abgegeben wird, und die Abdrücke der Zähnnchen des Hypostoms häufig auf Längsschnitten sichtbar sind. Auch bei meinen Untersuchungen hatte die Zementdicke innerhalb von 96 Stunden kontinuierlich zugenommen.

KUZNETSOVA (1957) beschrieb ebenfalls eine röhrenförmige Zementablagerung von *H. scupense*; der Zement war von Haarresten und Elementen der Epidermis durchsetzt. Dies trifft nach meinen Befunden nur für die oberflächliche Zementablagerung zu.

Nach Infestation mit *H. a. excavatum*-Adulten trat in der Epidermis, von Ansatz zu Ansatz früher, eine Auflockerung im Zellverband ein, die sich zur Blasenbildung steigerte. Nach 48 Stunden im 1. Ansatz, 12-48 Stunden im 2. Ansatz, 12 Stunden im 3. sowie 24 Stunden im 4. Ansatz war die Grenze zwischen Epidermis und Korium direkt neben dem Stichkanal (0-180 μ m) aufgehoben und durch eosinophile und neutrophile Granulozyten ersetzt. Der beginnende Zelluntergang mündete in eine nach Mehrfachbesatz immer früher eintretende Nekrose ein. In der weiteren Umgebung der Einstichstelle (360-540 μ m) kam es ebenfalls zur Bildung von Blasen, die neutrophile und eosinophile Granulozyten, Serum sowie ab dem 3. Ansatz Erythrozyten enthielten. Ins Korium wanderten bei Reinfestation deutlich mehr eosinophile Granulozyten ein als nach dem 1. Ansatz. Die Mastzellen reagierten mit einer von Ansatz zu Ansatz beschleunigten Degranulation.

Eine Degranulation von Mastzellen sowie die anschließende Infiltration eosinophiler Granulozyten beobachteten die meisten Autoren, die sich mit histologischen Untersuchungen der Rinderhaut nach Besatz mit Schildzecken beschäftigten (PAVLOVSKY und ALFEEVA, 1941; UZAKOV, 1963; KUZNETSOVA, 1957; RIEK, 1962; TATCHELL und MOORHOUSE, 1968; SCHLEGER und Mitarb., 1976; ALLEN, DOUBE und KEMP, 1977; BROWN, BARKER und ASKENASE, 1984). Über die Mechanismen, die diese Mastzelldegranulation und die anschließende Einwanderung eosinophiler Granulozyten auslösen, gehen die Meinungen jedoch auseinander.

Eine auf rein mechanische Faktoren oder Speichelbestandteile zurückzuführende Degranulation der Mastzellen (ALLEN, DOUBE

und KEMP, 1977; BINNINGTON und KEMP, 1980) erscheint mir im Falle von *H. a. excavatum* wenig wahrscheinlich, da die Degranulation nach Mehrfachbesatz beschleunigt erfolgte; dies weist auf ein durch Immunvorgänge ausgelöstes Geschehen hin.

RIEK (1962), TATCHELL und MOORHOUSE (1968) sowie SCHLEGER und Mitarb. (1976) führten die Degranulation auf eine Immunreaktion vom Soforttyp I zurück, bei der es nach Antigenkontakt mit IgE-Antikörpern auf der Mastzelloberfläche zur anaphylaktischen Freisetzung von Histamin, ECF-A und anderen Faktoren kommt, die eosinophile Granulozyten anlocken.

Die Bildung homozytotroper Antikörper beim Rind wiesen RIEK (1962) nach Besatz mit *B. microplus* im homologen PCA sowie ROSENBERG (1984) nach Infestation mit *H. a. excavatum* im heterologen PCA nach. Auch bei meinen Untersuchungen zeigte es sich, daß die Mastzellen im 2., 3. und 4. Ansatz schneller und in größerer Menge degranulierten als im 1. Ansatz. Dies ließe sich durch eine gesteigerte Affinität von IgE-Antikörpern zum Zeckenantigen nach Sensibilisierung (MOSSMANN und Mitarb., 1974) oder durch einen Anstieg der zur Verfügung stehenden IgE-Antikörper erklären. So hatten HAMMER, KICKHÖFEN und SCHMID (1971) nach mehrfacher Injektion von Kaninchen-Serum-Albumin bei Kühen verstärkte homozytotrope Aktivität im Serum festgestellt.

PARISH (1972) zeigte, daß bei anaphylaktischen Reaktionen im Meerschweinchen-Versuch neutrophile Granulozyten, nachdem sie zu Beginn der Reaktion dominieren, nach 8 Stunden verschwinden, während die eosinophilen Granulozyten nach 24 Stunden ihren Maximalwert erreicht haben, um dann abzusinken. Bei meinen Untersuchungen zeigte sich im Gegensatz dazu aber, daß auch nach 12-24 Stunden immer noch zahlreiche neutrophile Granulozyten vorhanden waren. Dies sowie die nach Mehrfachbesatz beschleunigte Nekrosebildung weisen auf die Möglichkeit der Beteiligung einer Reaktion vom Soforttyp III hin. Hierbei

kommt es nach Kontakt von IgG-Antikörpern mit Antigen zur Bildung von Immunkomplexen, welche die Aktivierung der Komplementkaskade in Gang setzen. Die Faktoren C_3 und C_5 wirken chemotaktisch auf Neutrophile, deren proteolytische Enzyme gemeinsam mit einer gestörten Blutversorgung des Gewebes zur Nekrose führen. C_5 löst auch eine anaphylaktische Degranulation von Mastzellen und Basophilen aus, die über Histamin und ECF-A eine Eosinophilenanlockung verursacht (TRAUTWEIN, 1982). Nach OPPENHEIM und POTTER (1981) dominieren im histologischen Bild allerdings eindeutig die neutrophilen Granulozyten über die vereinzelt auftretenden eosinophilen Granulozyten.

In Richtung auf eine Sofortreaktion vom Typ III weist weiterhin, daß ROSENBERG (1984) nach Mehrfachbesatz mit *H. a. excavatum* einen verstärkten Anstieg von IgG nach jedem neuen Ansatz feststellte. KUZNETSOVA (1957) beschrieb ebenfalls ein Vorherrschen von polymorphkernigen Leukozyten sowie eine Zelldetritusmasse neben dem Zement. In wieweit diese Veränderungen auf Immunreaktionen zurückzuführen sind, läßt sich nicht genau sagen, da die Immunitätslage der Rinder vor dem Besatz mit *H. scupense* nicht bekannt war. RUBAIRE-AKIIKI und MUTINGA (1980) deuteten das Auftreten von Neutrophilen beim Kaninchen zusammen mit präzipitierenden Antikörpern ebenfalls als Reaktion vom Soforttyp III, das gemeinsame Vorhandensein von homozytotropen Antikörpern und Eosinophilen als Reaktion vom Soforttyp I. Auch CAPRON und CAPRON (1982) wiesen auf die mögliche Kombination von Typ I, III und IV bei der Zeckenabwehr hin.

Im Intrakutantest wies ROSENBERG (1984) Sofortreaktionen nach Injektion von Speicheldrüsenantigen von *H. a. excavatum* nach. WILLADSEN und Mitarb. (1978) erreichten nach Injektion von 2 Allergenen von *B. microplus* ebenfalls Sofortreaktionen. Sie wiesen jedoch darauf hin, daß zwar die Gra-

de der Resistenz und der Sofortreaktionen eine positive Korrelation aufwiesen, nicht jedoch der IgE-Spiegel und die Immunität. Möglicherweise waren in beiden Fällen Immunreaktionen vom Typ III beteiligt.

Wie ARTHUR (1973), der die eingewanderten Neutrophilen auf chemotaktische Stimuli lysierter Zellen zurückführte, hielten auch BROWN, BARKER und ASKENASE (1984) die Neutrophilen für unspezifische Entzündungszellen. Sie beobachteten auch eine Mastzelldegranulation nach Mehrfachbesatz von Rindern mit *A. americanum*. Nach ihrer Ansicht wandert der größte Anteil der eosinophilen Granulozyten jedoch nicht auf die Mastzelldegranulation hin ein, sondern erst nach 18-24 Stunden, nachdem die basophilen Granulozyten degranuliert sind.

Im Meerschweinchen-Modell führten MCLAREN, WORMS und ASKENASE (1983) die Hautveränderungen nach Besatz mit *R. appendiculatus* auf die kutane basophile Hypersensitivität zurück. Beim ersten Kontakt mit Speicheldrüsenantigen nehmen nach ihrer Meinung Langerhanszellen das Antigen auf und präsentieren es T-Lymphozyten, Diese setzen Lymphokine frei, die am 4.-7. Tag eosinophile Granulozyten anlocken. Nach Zweitkontakt scheiden sensibilisierte T-Lymphozyten Lymphokine schon wesentlich früher aus, zusätzlich veranlassen T-Helfer-Zellen eine beschleunigte IgG₁-Produktion in Plasmazellen. IgG₁ und Lymphokine führen zu einer Basophilendegranulation bereits nach 12-18 Stunden, eosinophile Granulozyten wandern im Anschluß an die Degranulation ein. Hier liegt also ein Zusammenwirken humoraler und zellvermittelter Immunität vor.

WIKEL und ALLEN (1978) hielten ebenfalls T-Lymphozyten für maßgeblich an der Immunreaktion gegen Zecken beteiligt. Sie wiesen, ebenso wie WIKEL und OSBURN (1982) und ROSENBERG (1984) beim Rind, beim Meerschweinchen in vivo Spätreaktionen und zusätzlich dazu in vitro eine Steigerung der T-Lymphozyten-

blastogenese nach.

Auch wenn ich in meinen Untersuchungen den Nachweis basophiler Granulozyten nicht führte, sprechen für deren Vorhandensein die von ROSENBERG (1984) beobachteten Spätreaktionen sowie die Tatsache, daß es in der Epidermis beschleunigt zur Bildung der auch von BROWN, BARKER und ASKENASE (1984) sowie ALLEN, DOUBE und KEMP (1977) diagnostizierten Blasen kam. Eine Beteiligung der kutanen basophilen Hypersensitivität unterstreichen weiterhin die mit meinen Befunden übereinstimmenden Beobachtungen von ALLEN, DOUBE und KEMP (1977), daß nach Mehrfachbesatz mit *I. holocyclus* eine Auflösung der Grenze zwischen Epidermis und Korium eintritt. Gegen die alleinige Beteiligung der Basophilen bei der Anlockung der eosinophilen Granulozyten spricht allerdings, daß diese nach Mehrfachbesatz bereits nach 6 Stunden vermehrt auftraten, während die Basophilen erst nach 12-24 Stunden degranulieren.

Ob eine basophile kutane Hypersensitivität bei der Abwehr von *H. a. excavatum* beteiligt ist, muß durch weitere Versuche geklärt werden. Die vorliegenden Befunde sprechen allerdings für eine mögliche Kombination von Reaktionen vom Typ I, III und IV bei der Immunitätsbildung gegen *H. a. excavatum*. Ein solches Zusammenwirken verschiedener Reaktionstypen wird z. B. auch bei der Pathogenese der durch *Micropolyspora faeni* verursachten Pneumonitis des Rindes vermutet (WILKIE und NIELSON, 1981). Hier wird vermutet, daß die reaginen Antikörper als Vorläufer von Immunkomplexreaktionen und Reaktionen vom Spättyp fungieren.

Alle Autoren sind sich darin einig, daß sowohl Sofortreaktionen vom Typ I und III als auch Spätreaktionen vom Typ IV (kutane basophile Hypersensitivität) Mediatoren freisetzen, die eosinophile Granulozyten anlocken.

Allgemein wurde den eosinophilen Granulozyten eine wichtige Rolle in der Abwehr von Parasiten zugeordnet. So beschrieb BUTTERWORTH und Mitarb. (1977) die direkte toxische Wirkung z. B. gegen *Schistosoma mansoni* sowie DESSEIN und Mitarb. (1981) gegen *Trichinella spiralis*. SCHLEGER, LINCOLN und KEMP (1981) sahen die Rolle der Eosinophilen zusätzlich darin, Mastzellhistamin aufzunehmen und zur Anheftungsstelle zu transportieren. Dabei waren sie sich nicht klar darüber, ob das Histamin direkt toxisch wirkt oder nur vermehrtes Kratzen und damit eine mechanische Entfernung der Zecken auslöst.

Die Bedeutung des Histamins unterstreichen auch Versuche von KEMP und BOURNE (1980); sie wiesen nach, daß *B. microplus*-Larven nach Unterspritzung der Anheftungsstelle mit Histamin den Saugakt abbrachen. TATCHELL und BENNETT (1969) beobachteten nach Applikation von Antihistaminika einen Anstieg der Zahl vollgesogener Zecken. Da in meinen Versuchen eine Entfernung der Zecken durch Kratzen durch das Ausbinden der Tiere verhindert wurde, ist die Wirkung auf die Zecken wohl durch Histamin und die aus eosinophilen Granulozyten stammenden Produkte zu erklären.

Meine Untersuchungen haben gezeigt, daß sich die bei Mehrfachbesatz des Rindes mit *A. variegatum* histologisch faßbaren Veränderungen auf eine bei allen 4 Ansätzen auftretende Abflachung der Epidermis neben dem Stichkanal sowie auf eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten unter den Mundwerkzeugen beschränken. Die Degranulation von Mastzellen, welche nach allen Besätzen innerhalb der ersten 6 Stunden eintritt, zieht direkt neben der Einstichstelle (0-180 µm) keine Infiltration von eosinophilen Granulozyten nach sich; in der weiteren Umgebung der Einstichstelle (360-540 µm) wandern zwar eosinophile Granulozyten ein, jedoch nimmt ihre Zahl nach dem

2. Besatz ab. Die zellulären Veränderungen nach Besatz mit A. variegatum lassen den Schluß zu, daß Rinder gegen A. variegatum keine Immunität ausbilden können; möglicherweise ist ein immunsuppressiver Bestandteil des Speichels für dieses Phänomen verantwortlich.

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Versuchen mit H. a. excavatum bei Rindern histologisch faßbare Veränderungen, die von Ansatz zu Ansatz früher auftraten und stärker ausgeprägt waren. Die in der Epidermis gebildeten Blasen weiteten sich so aus, daß die Grenze zwischen Epidermis und Korium nicht mehr abgrenzbar war. Auch die Degranulation von Mastzellen im Korium mit anschließender Eosinophileninfiltration war deutlich. Darüberhinaus kam es von Ansatz zu Ansatz früher zum Untergang der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und damit zur Nekrose des Gewebes neben dem Stichkanal. In der direkten Umgebung der Einstichstelle (0-180 μ m) waren die zellulären Veränderungen in stärkerem Maße ausgeprägt als in der weiteren Umgebung (360-540 μ m). Die nach Mehrfachbesatz gesteigerte Reaktivität deutet darauf hin, daß es sich um eine Sensibilisierung des Rindes gegen H. a. excavatum im Sinne einer Immunreaktion handelt, wobei an der Ausbildung möglicherweise Allergien vom Soforttyp I und III sowie Spätreaktionen vom Typ der kutanen basophilen Hypersensitivität beteiligt sind.

V. Zusammenfassung

Je 3 Rinder wurden mit *Amblyomma variegatum*- und *Hyalomma anatolicum excavatum*-Adulten in zweiwöchigem Abstand viermal besetzt und Hautbiopsien vor dem Ansatz sowie 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach dem Ansaugen der Zecken entnommen. An histologischen Schnitten wurden die Zementablagerung, Epidermisveränderungen sowie die zelluläre Reaktion (insbesondere das Auftreten eosinophiler Granulozyten sowie Mastzellen) im Korium untersucht.

Bei beiden Zeckenarten umschloß der Zement das Hypostom schaftartig und nahm bis 96 Stunden nach Saugbeginn kontinuierlich zu. Besatz mit *A. variegatum* hatte in allen 4 Ansätzen eine gleichbleibende Abflachung und Nekrose der Epidermis neben der Einstichstelle zur Folge. Im Korium kam es gleich nach Saugbeginn zur Degranulation von Mastzellen, wobei die darauffolgende Eosinophileneinwanderung in der direkten Umgebung des Stichkanals ausblieb und 360-540 μ m neben der Penetrationsstelle von Ansatz zu Ansatz geringer ausfiel. Die geringgradigen Veränderungen nach Besatz mit *A. variegatum* sind eventuell auf immun-suppressive Eigenschaften der Zecke zurückzuführen.

Der Besatz mit *H. a. excavatum* löste eine von Ansatz zu Ansatz früher auftretende Blasenbildung in der Epidermis aus. Diese Blasen enthielten neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie ab dem 3. Ansatz Erythrozyten. Sie weiteten sich nach Mehrfachbesatz derart aus, daß eine Grenze zwischen Epidermis und Korium nicht mehr abgrenzbar war. Im Korium kam es von Ansatz zu Ansatz früher und in verstärktem Maße zur Degranulation von Mastzellen, die eine bei Mehrfachbesatz verstärkte Eosinophileninfiltration zur Folge hatte. Eingewanderte neutrophile und eosinophile Granulozyten verfielen immer früher der Nekrose. Nach Infestation mit *H. a. excavatum* reagieren Rinder demnach immunologisch, wobei Allergien vom Typ I, III und IV als Ursache für die zellulären Reaktionen vermutet werden.

Schillinger P.I.: Cellular reactions of cattle skin following multiple infestation with Amblyomma variegatum and Hyalomma anatolicum excavatum with special reference to eosinophil granulocytes and mast cells

Summary

3 cattle each were infested with adults of *Amblyomma variegatum* and *Hyalomma anatolicum excavatum* respectively for 4 times at intervals of 2 weeks. Skin biopsies were taken before as well as 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours after attachment. Histological sections of these samples were examined for attachment cement, changes in the epidermis and cellular reactions in the dermis (especially for the appearance of eosinophil granulocytes and mast cells).

Attachment cement formed a sheath-like tube around the hypostome in both species and increased continuously in width up to 96 hours after attachment. All 4 infestations with *A. variegatum* caused the same flattening and necrosis of the epidermis close to the point of attachment. No infiltration of eosinophils followed the early breakdown of mast cells adjacent to the tick mouthparts. At a distance of 360-540 μm however the infiltration of eosinophils decreased from infestation to infestation. An immunosuppressive effect induced by feeding *A. variegatum* might be responsible for these merely slight changes.

Infestation with *H. a. excavatum* caused epidermal vesiculation which occurred earlier in previously infested animals. The vesicles contained neutrophils and eosinophils and following the third infestation erythrocytes. Enlargement of these vesicles caused a complete disruption of the dermal-epidermal junction, which occurred earlier after multiple infestation. During rein-

festations earlier and increased mast cell degranulation occurred in the dermis than during the first infestation, this led to an increasing invasion of eosinophils. Lysis and necrosis of these eosinophils and neutrophils happened earlier during reinfestations. Infestations with *H. a. excavatum* evoked an immune response against this tick. Hypersensitivity reactions of type I, III and IV might be responsible for the cellular reactions.

VI. Literaturverzeichnis

- Allen, J.R., S.J. Humphreys (1979): Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. *Nature* 280, 491-493
- Allen, J.R., B.M. Doube, D.H. Kemp (1977): Histology of bovine skin reactions to *Ixodes holocyclus*. *Can. J. comp. Med.* 41, 26-35
- Arthur, D.R. (1973): The histopathology of skin following bites by *Hyalomma rufipes* (Koch 1844), and a theory on feeding by this tick. *J. ent. Soc. sth. Afr.* 36, 117-124
- Berenberg, J.L., P.A. Ward, D.E. Sonenshine (1972): Tick-bite injury: mediation by a complement derived chemotactic factor. *J. Immunol.* 109, 451-456
- Binnington, K.C., D.H. Kemp (1980): Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. *Adv. Parasit.* 18, 315-339
- Binta, M.G., M.P. Cunningham (1984): Cutaneous responses of cattle to extracts from *Rhipicephalus appendiculatus* larvae. *Vet. Parasit.* 15, 67-73
- Bourdeau, P. (1982): La lésion de fixation des tiques *Ixodoidea*: ses modalités et ses conséquences. *Réc. Méd. vét.* 158, 383-395
- Brossard, M. (1976): Relations immunologiques entre bovins et tiques, plus particulièrement entre bovins et *Boophilus microplus*. *Acta trop.* 33, 15-36
- Brown, S.J., R.W. Barker, P.W. Askenase (1984): Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: An acquired immune response characterized by cutaneous basophil infiltrates. *Vet. Parasit.* 16, 147-165

- Brown, S.J., M.J. Worms, P.W. Askenase (1983): *Rhipicephalus appendiculatus*: Larval feeding sites in guinea pigs actively sensitized and receiving immune serum. *Exp. Parasit.* 55, 111-120
- Butterworth. A.E., J.R. David, D. Franks, A.A.F. Mahmoud, D. H. David, R.F. Sturrock, V. Houba (1977): Antibody dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: damage by purified eosinophils. *J. exp. Med.* 145, 136-150
- Capron, M., A. Capron (1982): Role of mast cells and basophils in immune defense against parasites. In: Frank W. (ed.): *Immune reactions to parasites*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York 89-100
- Centurier, C., R. Klima (1978/79): Ein Beitrag zur Kenntnis der Biologie von *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794). *Z. ang. Ent.* 87, 131-142
- Chinery, W.A., E. Ayitey-Smith (1977): Histamine blocking agent in the salivary gland homogenate of the tick *Rhipicephalus sanguineus sanguineus*. *Nature* 265, 366-367
- Cowdry, E.V., W.B.C. Danks (1933): Studies on east coast fever. II. Behaviour of the parasite and the development of distinctive lesions in susceptible animals. *Parasitology* 25, 1-63
- Dessein, A.J., W.L. Parker, S.L. James, J.R. David (1981): IgE antibody and resistance to infection. I. Selective suppression of the IgE antibody response in rats diminishes the resistance and the eosinophil response to *Trichinella spiralis* infection. *J. exp. Med.* 153, 423-429
- Dvorak, H.F., A.M. Dvorak, B.A. Simpson, H.G. Richerson, S.

- Leskowitz, M.J. Karnovsky (1970): Cutaneous basophil hypersensitivity II. A light and electron microscopic description. J. exp. Med. 132, 558-582
- Hammer, D.K., B. Kickhöfen, T. Schmid (1971): Detection of homocytotropic antibody associated with a unique immunoglobulin class in the bovine species. Eur. J. Immunol. 1, 249-257
- Heller-Haupt, A., M.R.G. Varma, A.O. Langi (1981): Acquired resistance to ixodid ticks in laboratory animals. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 75, 147-148
- Kemp, D.H., A. Bourne (1980): Boophilus microplus: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae - studies in vivo and in vitro. Parasitology 80, 487-496
- Kuznetsova, G.M. (1957): Morphological changes in the skin of cattle parasitized by the Hyalomma scupense field tick. Trudy Moskov. Vet. Akad. 19, 304-317 (russisch). NAMRU-3-translation T1410
- Mbemba, Z.Z. (1983): Histologische Untersuchungen über lokale Abwehrreaktionen bei Schafen nach Infestation mit der Schildzecke Rhipicephalus appendiculatus (Neumann, 1901). Vet. med. Diss., München
- McGowan, J.M., R.W. Barker, K.H. Holscher, J.T. Homer, R.W. McNew (1981): Success of tick feeding on calves immunized with Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae) extract. J. med. Entomol. 18, 328-332
- McLaren, D.J., M.J. Worms, P.W. Askenase (1983): Cutaneous basophil associated resistance to ectoparasites (ticks). Electron microscopy of Rhipicephalus appendiculatus larval feeding sites in actively sensitised guinea pigs and recipients of immune serum. J. Pathology 139, 291-308

- Moorhouse, D.E. (1973): On the morphogenesis of the attachment cement of some ixodid ticks. Proc. 3rd Int. Cong. Acarol. Prague, 1971, The Hague 527-529
- Mossmann, H., M. Meyer-Delius, U. Vortisch, B. Kickhöfen, D.K. Hammer (1974): Experimental studies on the bridging hypothesis of anaphylaxis. J. exp. Med. 140, 1468-1480
- Norval, R.A.I. (1975): Host-tick interactions: A review. Proc. I. Cong. ent. Soc. sth. Afr. , 195-201
- Norval, R.A.I. (1978): Repeated feeding of *Amblyomma hebraeum* (Acarina: Ixodidae) immatures on laboratory hosts. Host effects on tick yield, engorged weight and engorgement period. J. Parasit. 64, 910-917
- Oppenheim, J.J., M. Potter (1981): Immunity and inflammation. In: Oppenheim, J.J., D.L. Rosenstreich, M. Potter (eds.): Cellular functions in immunity and inflammation. London, New York, 8-26
- Parish, W.E. (1972): Eosinophilia: II. Cutaneous eosinophilia in guinea pigs mediated by passive anaphylaxis with IgG₁ or reagin, and antigen-antibody complexes; its relation to neutrophils and to mast cells. Immunology 23, 19-34
- Pavlovsky, E.M., S.P. Alfeeva (1941): Histopathological changes in the skin of cattle following the bite of the tick *Ixodes ricinus*. Trudy Voenno.-Med. Akad. Krasnoi Armii 25, 153-160 (russisch). NAMRU-3-translation T452
- Riek, R.F. (1962): Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). Austr. J. agric. Res. 13, 532-550

- Roberts, J.A., D.J. Kerr (1979): *Boophilus microplus*: Passive transfer of resistance in cattle. *J. Parasit.* 62, 485-489
- Rosenberg, R. (1984): Humorale Reaktionen bei Rindern nach mehrmaligem Besatz mit *Rhipicephalus appendiculatus*, *Hyalomma anatolicum excavatum* und *Amblyomma variegatum* sowie dessen Einfluss auf die Zeckenentwicklung. *Vet. med. Diss.*, München
- Rubaire-Akiki, C.M., M.J. Mutinga (1980): Immunological reactions associated with rabbit resistance to *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann) infestations. *Bull. Anim. Hlth Prod. Afr.* 28, 49-59
- Schleger, A.V., D.H. Kemp, D.T. Lincoln, R.V. McKenna, J.A. Roberts (1976): *Boophilus microplus*: Cellular responses to host resistance. *Austr. J. biol. Sci.* 29, 499-512
- Schleger, A.V., D.T. Lincoln, D.H. Kemp (1981): A putative role for eosinophils in tick rejection. *Experientia* 37, 49-50
- Soter, N.A., F.K. Austen (1981): Urticaria and angiooedema: The mast cell, its diverse mediators, and its role in cutaneous inflammation. In: Safai, B., R.A. Good (eds.): *Immunodermatology*. Plenum Publishing Corporation New York, 273-292
- Tatchell, R.J., G.F. Bennett (1969): *Boophilus microplus*: Antihistaminic and tranquilizing drugs and cattle resistance. *Exp. Parasit.* 26, 369-377
- Tatchell, R.J., D.E. Moorhouse (1968): The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. The sequence of host tissue changes. *Parasitology* 58, 441-459

- Theis, J.H., P.D. Budwieser (1974): Rhipicephalus sanguineus: Sequential histopathology at the host-arthropod interface. Exp. Parasit. 36, 77-105
- Trautwein, G. (1982): Spezifische Krankheitsbedingungen. In: Schulz, L.C. (ed.): Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 39-80
- Uzakov, U.Ya. (1963): Morphological changes occurring in the skin of cattle parasitized by ticks of ixodid family. Trudy Uzbek. Nauch.-Issled. Inst. Vet. 15, 109-113 (russisch). NAMRU-3-translation T1334
- Whelen, A.C., J.E. George, R.L. Asburn, S.K. Wikel (1984): DOT-ELISA to examine serologic responses of Bos taurus and Bos indicus to ixodid tick infestations. Fed. Proc. 43, 1628
- Wikel, S.K. (1982): Influence of Dermacentor andersoni infestation on lymphocyte responsiveness to mitogens. Ann. trop. Med. Parasit. 76, 627-632
- Wikel, S.K., J.R. Allen (1982): Immunological basis of host resistance to ticks. In: Obenchain, F.D., R. Galun (eds.): Physiology of ticks. Oxford, 169-196
- Wikel, S.K., J.R. Allen (1982): Characterization of the immune response in tick resistant guinea pigs. In: Wilde J.K.H. (ed.): Tick-borne diseases and their vectors. University of Edinburgh, 77-78
- Wikel, S.K., L.J. Osburn (1982): Immune responsiveness of the bovine host to repeated low-level infestations with Dermacentor andersoni. Ann. trop. Med. Parasit. 76, 404-414

- Wilkie, B.N., K. Nielson (1981): Bovine hypersensitivity pneumonitis and reaginic antibody. In: Butler J.E. (ed.): The ruminant immune system. Plenum Press New York, 693-709
- Willadsen, P., J.D. Kerr, J.A. Roberts, P.G. Williams (1978): Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. Int. J. Parasit. 8, 89-95.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boch danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und die Ermöglichung der Durchführung meiner Arbeit unter den besten Bedingungen.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. R. Gothe für die Ermöglichung der Beendigung meiner Dissertation am von ihm geleiteten Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Centurier, der mich bei meiner Arbeit betreute, sowie bei Herrn Dr. Feder, Institut für Tieranatomie, für seine Anleitung und Beratung bei der histologischen Auswertung, bedanken.

Meinen Dank möchte ich auch Fr. R. Schmid für ihr stets gezeigtes Entgegenkommen und ihre technische Hilfe aussprechen.

Lebenslauf

- 1959: Am 18.7. in Augsburg als Tochter des Handelsvertreters Hubert Schillinger und seiner Ehefrau Irmgard Schillinger, geb. Vigilant geboren
- 1965-1969: Besuch der Volksschule in Augsburg
- 1969-1978: Besuch des Gymnasiums in Augsburg
- 1978-1984: Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Approbation am 14.4.84
- 1984-1985: Doktorarbeit am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

